

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Martinović

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Martinović

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ SEDIMENTA

Diplomski rad

Voditelj rada: izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi ispitnog povjerenstva:

izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

prof. dr. sc. Tomislav Bolanča

izv. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, srpanj 2017.

*Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog
inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.*

Na početku bih se zahvalila svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju, a posebno tehničarkama Tanji Ivančić i Slavici Kos na pruženoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem se Plivi Hrvatska d.o.o i Mislavu Runji na strpljenju, volji i podršci pri izradi diplomskog rada.

Ponajviše se zahvaljujem svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na pruženoj prilici, uloženom vremenu, iznimnom strpljenju, te velikoj motivaciji i konstantnoj pomoći koja mi je bila potrebna.

Također, veliko hvala mojim roditeljima, rodbini i prijateljima.

SAŽETAK

U ovom diplomskom radu prikazan je postupak optimizacije raspršenja matice sedimenta kroz čvrstu fazu (MSPD) trinaest farmaceutika (azitromicin, tiamulin, imatinib, febantel, torasemid, omeprazol, linezolid, prazikvantel, etodolak, sulfametazin, sulfafurazol, albendazol i levamisol) koji zbog svojih različitih karakteristika pripadaju različitim skupinama lijekova. Ekstrakti dobiveni MSPD metodom snimani su na UHPLC uređaju.

U svrhu određivanja optimalnih uvjeta korištena su različita otapala (čista otapala kao i njihove smjese) te smjese otapala s kiselinama. Utvrđeno je da je za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika raspršenjem matice sedimenta kroz čvrstu fazu odabrana kombinacija otapala metanol:aceton=1:1, volumena 5 mL na sorbensu C18.

Optimirana i validirana metoda uspješno je primjenjena na realnim uzorcima sedimenta što ukazuje na efikasnost ove metode za identifikaciju i kvantifikaciju farmaceutika iz različitih uzoraka sedimenta.

Ključne riječi: raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu, farmaceutici, sediment, UHPLC

ABSTRACT

EXTRACTION OF FARMACEUTICS FROM SEDIMENTS

This thesis shows the process optimization of matrix-solid phase dispersion of thirteen pharmaceuticals (azithromycin, tiamulin, imatinib, febantel, torasemide, omeprazole, linezolid, praziquantel, etodolac, sulphamethazine, sulfafurazole, albendazole and levamisole) which has mutually different properties and belong to different groups of pharmaceuticals. The obtained MSPD extracts were analyzed by UHPLC.

To determine the optimal conditions, different solvents (pure solvent and various mixture of solvents) and mixture of solvents and acids were used. It was achieved that optimal conditions for extraction of pharmaceuticals by MSPD is methanol:acetone 1:1 as elution solvent, volume of elution solvent is 5 mL and C18 sorbent.

Optimized and validated method was successfully applied to real sediment samples suggesting efficiency of method for the identification and quantification of pharmaceuticals from different sediment samples.

Key words: matrix-solid phase dispersion, pharmaceuticals, sediments, UHPLC

SADRŽAJ

SAŽETAK

ABSTRACT

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Farmaceutici.....	2
2.1.1. Antihelmintici.....	2
2.1.1.1. Albendazol.....	3
2.1.1.2. Febantel.....	4
2.1.1.3. Levamisol.....	5
2.1.1.4. Prazikvantel.....	6
2.1.2. Antibiotici.....	7
2.1.2.1. Azitromicin.....	8
2.1.2.2. Linezolid.....	9
2.1.2.3. Sulfafurazol.....	10
2.1.2.4. Sulfametazin.....	11
2.1.2.5. Tiamulin.....	12
2.1.3. Citostatici.....	13
2.1.3.1. Imatinib.....	14
2.1.4. Diuretici.....	15
2.1.4.1. Torasemid.....	16
2.1.5. Ostali farmaceutici.....	17
2.1.5.1. Etodolak.....	17
2.1.5.2. Omeprazol.....	18
2.2. Farmaceutici u okolišu.....	19
2.2.1. Farmaceutici u sedimentu.....	20
2.3. Određivanje farmaceutika u okolišu.....	21

2.3.1. Priprema uzorka – metoda ekstrakcije.....	21
2.3.1.1. Ekstrakcija tekuće – tekuće.....	21
2.3.1.2. Ekstrakcija čvrsto – tekuće.....	22
2.3.1.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidom.....	22
2.3.1.2.2. Ekstrakcija mikrovalovima.....	23
2.3.1.2.3. Ubrzana ili poboljšana ekstrakcija otapalom.....	23
2.3.1.2.4. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD)	23
2.3.2. Kromatografska analiza farmaceutika.....	25
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija	25
2.3.2.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	25
2.3.2.1.2. Kromatografski parametri.....	27
2.4. Validacija analitičkih metoda.....	29
2.4.1. Osnovni parametri validacije	29
2.5. DryLab metoda.....	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	33
3.1. Materijali.....	33
3.1.1. Sediment.....	33
3.1.2. Kemikalije.....	33
3.1.3. Sorbens.....	33
3.1.4. Farmaceutici.....	34
3.2. Instrumenti.....	35
3.2.1. Analitička vaga.....	35
3.2.2. Ultrazvučna kupelj.....	35
3.2.3. Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom.....	36
3.2.4. Rotacijski uparivač.....	36
3.2.5. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (UHPLC).....	36
3.3. Opis rada.....	37

3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika.....	37
3.3.2. Postupak ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu.....	37
3.3.3. Analiza uzorka pomoću tekućinskog kromatografa ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)	38
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	41
4.1. Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta raspršenjem kroz čvrstu fazu.....	41
4.2. Validacija.....	66
4.3. Utjecaj matice.....	70
4.4. Analiza realnih uzoraka.....	71
5. ZAKLJUČAK.....	74
6. LITERATURA.....	75
7. ŽIVOTOPIS.....	77

1.UVOD

Humani i veterinarski farmaceutici kontinuirano se unose u okoliš ispuštanjem raznih industrijskih i otpadnih voda, nepropisanim odlaganjem ili kao izlučevine. Zbog svojih složenih struktura i fizikalno- kemijskih karakteristika njihovo prisustvu u vodama, tlima i sedimentima uzrokuje niz posljedica za biljni i životinjski svijet.

Potencijalno štetan učinak farmaceutika i njihovih aktivnih metabolita na okoliš, kao niti njihova ekotoksikološka svojstva nisu dovoljno poznati, pa su oni svrstani u skupinu „novih zagađivala“ za koje zasad nije ozakonjena maksimalna dopuštena koncentracija u okolišu. Spoznaja o njihovoj opasnosti rezultirala je njihovim intenzivnim istraživanjem. Da bi se moglo pratiti njihovo ponašanje u okolišu neophodan je razvoj analitičkih metoda određivanja farmaceutika. Važno je razviti takve metode kojima će se omogućiti određivanje različitih grupa ovih spojeva u jednom koraku.

Cilj ovog rada bio je optimirati postupak raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD) trinaest farmaceutika (azitromicin, tiamulin, imatinib, febantel, torasemid, omeprazol, linezolid, prazikvantel, etodolak, sulfametazin, sulfafurazol, albendazol i levamisol) iz uzorka sedimenta promjenom izbora otapala i/ili smjese otapala te promjenom njihovog volumena. Nakon dobivenih optimalnih uvjeta procjenjena je validacija metode parametrima linearnosti, ponovljivosti, obnovljivosti, granicama detekcije (GD), granicama kvantifikacije te utjecajem matice uzorka. Nakon validacije metoda je još primjenjena na sedam različitih uzoraka sedimenata.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Pojam "farmaceutici" ili jednostavnije, lijekovi, su kemijske tvari namjenjene za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju bolesti. Mogu biti prirodnog ili sintetičkog porijekla. Obuhvaćaju široku klasu spojeva koji se razlikuju u svojoj strukturi, funkciji, ponašanju i djelovanju. Razvijeni su da bi izazvali biološki učinak. Upotrebljavaju se kod ljudi i životinja za liječenje bolesti, borbu protiv infekcije i / ili smanjenje simptoma. Dijelev se na različite načine kao što su: način djelovanja, primjena, utjecaj biološkog sustava, terapijski učinci. Prema svome djelovanju i kemijskoj strukturi, farmaceutici se mogu podijeliti na analgetike i prouupalne lijekove, antibiotike, antidepresive, antihistaminike, regulatore masnoća u krvi, regulatore tlaka, hormone, steroide, antitumorske lijekove, β -blokatore, antiepileptike i diuretike [1].

Skupina farmaceutika ispitivana u ovom radu su: antihelmintici, antibiotici, citostatici, diuretici i ostali.

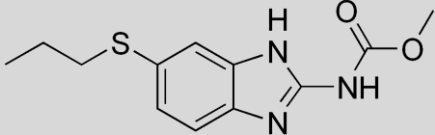

2.1.1. Antihelmintici

Antihelmintici su lijekovi za liječenje bolesti uzrokovane crijevnim parazitima. Ljudi su nosioci helminta (crva) jedne ili druge vrste i najčešće ove infekcije stvaraju samo neugodan osjećaj i ne izazivaju teže zdravstvene poremećaje. Najvažniji primjeri crva koji žive u crijevnom traktu domaćina su: pljosnati crvi (cestode) i intertinalni valjkasti crvi. Antihelmintici djeluju izazivajući paralizu crva ili oštećujući njegov unutrašnji omotač, što vodi parcijalnoj digestiji ili odbacivanju od strane imunog sustava domaćina. Glavne grupe antihelmintika prema kemijskim i strukturnim karakteristikama su: piperazini, benzimidazoli, heterocikli, antimalarici, prirodni produkti [2,3].

Ispitivani antihelmintici u ovom radu su: albendazol, febantel, levamisol, prazikvantel.

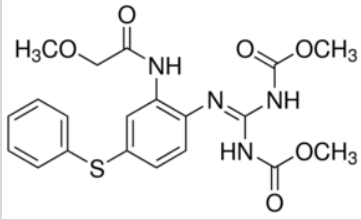

2.1.1.1. Albendazol

Tablica 1. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola [4,5,6] .

Ime	Albendazol
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	metil <i>N</i> -[6-(propilsulfanil)-1 <i>H</i> -1,3-benzodiazol-2-il]karbamat
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
M/gmol ⁻¹	265,333
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	266/234
CAS broj	54965-21-8
Konstante	log <i>K</i> _{ov} =3,07 Točka tališta=209 °C p <i>K</i> _{k1} = 10,26 p <i>K</i> _{k2} = 2,80
Opis	Antihelmintik širokog spektra djelovanja. Ometa metabolizam parazita te sprječava ugrađivanje glukoze u njegova tri razvojna stupnja i time se paraziti prestaju kretati i umiru.
Proizvod	

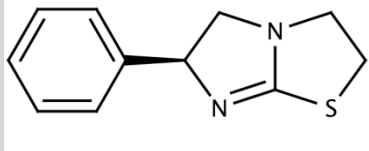

2.1.1.2. Febantel

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva febantela [4,7,8].

Ime	Febantel
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	Dimetil[[2-(2-dimetiloksiacetamido)-4-(feniltio)fenil]imidokarbonil]dikarbamat
Empirijska formula	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S
M/gmol ⁻¹	446,49
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	447/415
CAS broj	58306-30-2
Konstante	logK _{ov} =1,53 Točka tališta=258,19 °C pK _k = 3,8
Opis i način djelovanja	Prolijek koji spada u skupinu antihelmintika koji se <i>in vivo</i> djelomično metabolizira u fenbendazol i oksibendazol. Djeluje na način da inhibira fumarat reduktazu u crvima i time blokira unos glukoze. Upotrebljava se isključivo u veterinarskoj medicini za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih parazita, plućnih crva i trakavice.
Proizvod	

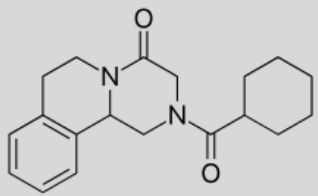

2.1.1.3. Levamisol

Tablica 3. Fizikalno- kemijska svojstva levamisola [7].

Ime	Levamisol
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	(6S)-6-fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol
Empirijska formula	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S
M/gmol ⁻¹	204,292
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	205/178
CAS broj	14769-73-4
Konstante	logK _{ov} =2,87 Točka tališta=112,10 °C pK _k = 6,98
Opis i način djelovanja	<p>Levamisol je antihelmintik koji se koristi u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Kod ljudi se koristi za bolesti povezane sa imunološkim sustavom, kronične infekcije i rak. Djeluje tako da blokira redukciju fumarata i oksidaciju sukcinata čime dolazi do paralize crva.</p>
Proizvod	

2.1.1.4. Prazikvantel

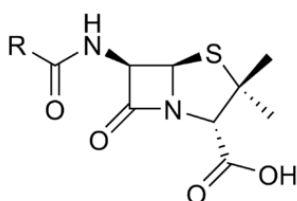
Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva prazikvantela [6,7].

Ime	Prazikvantel
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	2-cikloheksil-karbonil-1H,2H,3H,4H,6H,7H,11bH-piperazino[2,1-a]izokinolin-4-on
Empirijska formula	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂
M/gmol ⁻¹	312,411
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	313/203
CAS broj	55268-74-1
Konstante	logK _{ov} =2,42 Točka tališta=202,39 °C pK _k = 19,38
Opis i način djelovanja	Pripada skupini heterocikličkih antihelmintika. Kao i albendazol ima širok spektar djelovanja. Na staničnoj membrani parazita povećava provodnost Ca ²⁺ iona što uzrokuje paralizu mišića.
Proizvod	

2.1.2. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koje koristimo za liječenje bolesti uzrokovanih bakterijama, odnosno, to su produkti metabolizma nekih mikroorganizama koji nepovoljno djeluju na razvoj i razmnožavanje drugih mikroorganizama. Njihovo djelovanje usmjereno je isključivo na bakterije, Gram-pozitivne i Gram-negativne, na način da djeluju na njihovu strukturu i rast.

U samim počecima kao antibiotici upotrebljavali su se prirodni spojevi koje stvaraju gljive (plijesan), dok se danas koriste uglavnom polusintetski i sintetski antibiotici. 1928. godine Alexander Fleming otkrio je da plijesan *Penicillium notatum* luči antibiotik penicilin i upravo je on postao prvi antibiotik koji se proizvodio u količinama dovoljnim za spašavanje milijuna života [9].



Slika 1. Struktura penicilina

Jedan od najvećih problema današnje medicine vezan uz antibiotike jest razvoj rezistencije bakterija na njih. Bakterije zahvaljujući svojim izvrsno razvijenim mehanizmom genetske prilagodbe postaju otporne na antibiotike na nekoliko načina: proizvodnjom enzima pomoću kojih se mijenja struktura antibiotika, promjena permeabilnosti za lijekove, proizvodnja enzima, ...

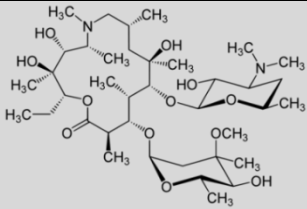
Podjela antibiotika je raznovrsna. Dije se prema: spektru djelovanja, učinku, mehanizmu djelovanja, strukturnim karakteristikama. Najbrojniji su oni prema strukturnim karakteristikama. Tu pripadaju: β -laktami, tetraciklini, makrolidi, kinolini i ostali antibiotici [10].

Makrolidi su skupina antibiotika građena od makrocikličkog laktonskog prstena na koji su glikozidnom vezom vezani ugljikohidrati. Djeluju tako da se vežu na 50S podjedinicu ribosoma i sprječavaju kontakt tRNK na koju je vezana AK s mRNK, te na taj način ometaju sintezu proteina.

Antibiotici analizirani u ovom radu su: azitromicin, linezolid, sulfafurazol, sulfametazin i tiamulin.

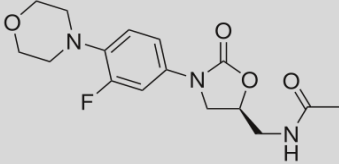

2.1.2.1. Azitromicin

Tablica 5. Fizikalno- kemijska svojstva azitromicina [10,11,12].

Ime	Azitromicin
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11- { [(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6- methiloksan-2-il]oksi }-2-etil-3,4,10-trihidroksi-13- { [(2R,4R,5S,6S)-5-hidroksi-4-metoksi-4,6- dimetiloksan-2-il]oksi }-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1- oksa-6-azaciklopentadekan-15-on
Empirijska formula	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$
M/gmol ⁻¹	748,984
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	750/591
CAS broj	83905-01-5
Konstante	logK _{ov} =4,02 Točka tališta=114 °C pK _k = 8,74
Opis i način djelovanja	Azitromicin se upotrebljava kao lijek za liječenje raznih bakterijskih infekcija gornjih i donjih dišnih puteva, infekcija kože i potkožnog tkiva, spolno prenosivih bolesti, infekcija želuca i slično. Djeluje ciljano prenoseći se do mjesta infekcije putem bijelih krvnih stanica. Veže se na podjedinicu 50S bakterijskog ribosoma spječavajući sintezu bakterijskih proteina, čime onemogućava rast i razmnožavanje bakterije.
Proizvod	

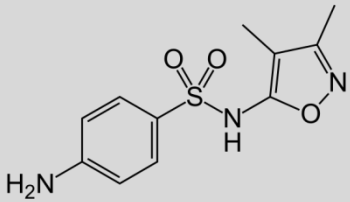

2.1.2.2. Linezolid

Tablica 6. Fizikalno-kemijska svojstva linezolida [11,13].

Ime	Linezolid
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-(3-fluor-4-morfolin-4-ilfenil)-2-okso-1,3-oksazolidin-5-il]metil}acetamid
Empirijska formula	$C_{16}H_{20}FN_3O_4$
M/gmol ⁻¹	337,346
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	338/296
CAS broj	165800-03-3
Konstante	log K_{ov} = 0,232 Točka tališta = 182 °C p K_k = 1,8
Opis i način djelovanja	Linezolid je antibiotik koji se koristi za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama. Kao inhibitor sinteze proteina utječe na sposobnost bakterija da proizvode proteine i time potiče zaustavljanje rasta ili smrt bakterije.
Proizvod	

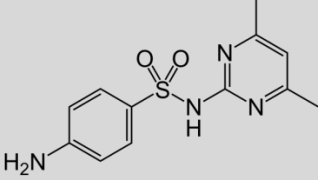

2.1.2.3. Sulfafurazol

Tablica 7. Fizikalno-kemijska svojstva sulfafurazola [11].

Ime	Sulfafurazol
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	4-amino- <i>N</i> -(dimetil-1,2-oksazol-5-il)benzen-1-sulfonamid
Empirijska formula	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
M/gmol ⁻¹	267,304
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	268/156
CAS broj	127-69-5
Konstante	<p>log<i>K</i>_{ov}=1,01</p> <p>Točka tališta=194° C</p> <p>p<i>K</i>_{k1} = 1,5</p> <p>p<i>K</i>_{k2} = 5</p>
Način djelovanja	<p>Sulfafurazol je sulfonamidni antibiotik.</p> <p>Sulfonamidi su sintetski bakteriostatski antibiotici sa širokim spektrom djelovanja protiv većine Gram-pozitivnih i mnogih Gram-negativnih organizama. Sulfonamidi inhibiraju umnožavanje bakterija djelujući kao kompetitivni inhibitori <i>p</i>-aminobenzojeve kiseline u ciklusu metabolizma folne kiseline.</p> <p>Bakterijska osjetljivost je ista za različite sulfonamide, a otpornost na jedan sulfonamid pokazuje otpornost na sve.</p>
Proizvod	

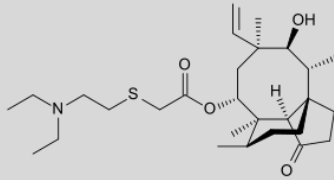

2.1.2.4. Sulfametazin

Tablica 8. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametazina [11,12].

Ime	Sulfametazin
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	4-amino- <i>N</i> -(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
M/gmol ⁻¹	278,33
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	279/186
CAS broj	57-68-1
Konstante	<p>$\log K_{ov} = 0,76; 0,19$</p> <p>Točka tališta = 200 °C</p> <p>$pK_{k1} = 2,65 \pm 0,2$</p> <p>$pK_{k2} = 7,4 \pm 0,2$</p>
Opis i način djelovanja	<p>Sulfametazin ima bakteriostatsko djelovanje.</p> <p>Djeluje na način da kompetitivnom inhibicijom ugrađuje <i>p</i>-amino- benzojevu kiselinu u molekulu folne kiseline. Na taj način remeti sintezu bjelančevina i purinskih i pirimidinskih baza.</p>
Proizvod	

2.1.2.5. Tiamulin

Tablica 9. Fizikalno-kemijska svojstva tiamulina [11,12].

Ime	Tiamulin
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>aR</i> ,10 <i>R</i>)-5-Hidroksi-4,6,9,10-tetrametil-1-okso-6-vinildekahidro-3 <i>a</i> ,9-propanociklopenta[8]annulen-8-il {[2-(dietilamino)etil]sulfanil}acetat
Empirijska formula	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S
M/gmol ⁻¹	493,742
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	494/192
CAS broj	55297-95-5
Konstante	log <i>K</i> _{ov} =4,75 Točka tališta=147°C p <i>K</i> _k = 9,51
Opis i način djelovanja	Tiamulin je antibiotik širokog spektra djelovanja. Snažno djeluje na mikroplazme, treponeme, Gram-pozitivne i Gram-negativne bakterije. Djeluje na način da koči sintezu bjelancevina vežući se na njihove ribosome i time umanjuje aktivnost bakterija.
Proizvod	

2.1.3. Citostatici

Citostatici su lijekovi za liječenje zloćudnih tumora. Rak (karcinom) je bolest koja se očituje brzim i nekontroliranim umnažanjem zloćudnih tumorskih stanica. Stanice raka se premještaju iz primarnog mjesta nastanka u neko susjedno ili udaljeno mjesto u tijelu i tvore izrasline, tj. tumore.

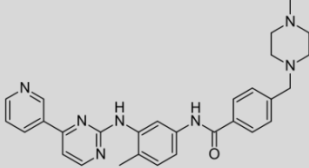

Citostatici se dijele u četiri skupine: alkilirajući agensi, antimetaboliti, protutumorski lijekovi te sredstva biljnog porijekla. Smatraju se veoma djelotvornim lijekovima jer uništavaju ćelije tumora ili zaustavljaju njihov rast. Prvi alkilirajući agens, sumporov iperit, sintetiziran je u 19. stoljeću. Nedugo nakon, točnije 1942. godine sintetiziran je i dušikov iperit i upravo se ta godina smatra početkom razvoja moderne kemoterapije zloćudnih tumora [14].

Glavni nedostatak ove skupine lijekova je taj što je liječenje citostaticima često vrlo naporno za tijelo. Citostatik napadajući stanice raka istovremeno napada i zdrave stanice čime izaziva niz neželjenih posljedica. Međutim, razvoj molekularne biologije i genetike zadnjih godina bitno je pridonio razumijevanju nastanka zloćudnih tumorskih stanica i njihovom umnažanju stoga se vjeruje da će te spoznaje uvelike pomoći u razvoju novih, manje toksičnih protutumorskih lijekova [15].

Citostatik ispitivan u ovom radu je imatinib.

2.1.3.1. Imatinib

Tablica 10. Fizikalno-kemijska svojstva imatiniba [11,15].

Ime	Imatinib
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	4-[(4-metilpiperazin-1-il)methyl]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamid
Empirijska formula	C ₂₉ H ₃₁ N ₇ O
M/gmol ⁻¹	493,603
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	494/394
CAS broj	152459-95-5
Konstante	logK _{ov} = 3,218 Točka tališta= 226 °C pK _k = 8,27
Opis i način djelovanja	Imatinib je lijek iz skupine citostatika koji inhibiraju protein-tirozin kinazu. Predstavlja rijedak primjer tzv. racionalnog pristupa razvoja lijeka temeljenog na sprječavanju procesa provođenja signala. Meta mu je signalna molekula kinaza: Bcr-Abl. Primjenjuje se u liječenju kronične mijeloične leukemije, stromalnih tumora želučano-probavnog trakta i nekih drugih zloćudnih tvorevina.
Proizvod	

2.1.4. Diuretici

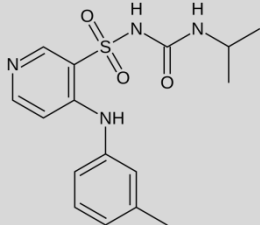

Diuretici su skupina lijekova čija upotreba dovodi do povećanja izlučivanja soli, prvenstveno natrijeva klorida, te vode. Pojačano izlučivanje vode je sekundarno stoga se diuretici ujedno nazivaju i saluretici. Primjenjuju se kod stanja kao što su: akutni edemi, kronični edemi, zatajenje srca, zatajenje bubrega, hipertenzija,...

Prema mehanizmu i djelovanju dijele se na: inhibitore karboanhidraze, diuretike Henleove petlje, tiazide i tiazidima slične diuretike, osmotske diuretike [15].

Diuretik ispitivan u ovom radu je torasemid.

2.1.4.1. Torasemid

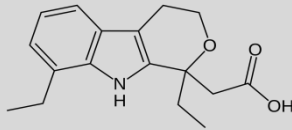

Tablica 11. Fizikalno kemijska svojstva torasemida[11].

Ime	Torasemid
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	1-({4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il} sulfonil)-3-(propan-2-il)urea
Empirijska formula	$C_{16}H_{20}N_4O_3S$
M/gmol ⁻¹	348,421
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	349/264
CAS broj	56211-40-6
Konstante	$\log K_{ov} = 2,404$ Točka tališta=164 °C $pK_k = 7,1$
Opis i način djelovanja	<p>Torasemid je diuretik Henleove petlje, strukturni derivat anilinopiridin sulfoniluree. Inhibira resorpciju natrija i klora u uzlaznom, debljem kraju Henleove petlje. Torasemid poboljšava rad srca, smanjujući volumen plazme .</p>
Proizvod	

2.1.5. Ostali farmaceutici

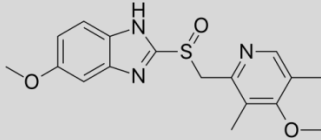

2.1.5.1. Etodolak

Tablica 12. Fizikalno-kemijska svojstva etodolaka [11,16].

Ime	Etodolak
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	2-{1,8-dietil-1H,3H,4H,9H-pirano[3,4-b]indol-1-yl}octena kiselina
Empirijska formula	$C_{17}H_{21}NO_3$
M/gmol ⁻¹	287,35
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	288/172
CAS broj	41340-25-4
Konstante	logK _{ov} =2,5 Točka tališta =148 °C pK _k = 4,65
Opis	Etodolak spada u skupinu nesteroidnih protuupalnih lijekova. Koristi se za ublažavanje bolova i upala kod reumatskog artritisa i osteoartritisa te za snižavanje povišenje tjelesne temperature.
Način djelovanja	Djeluje kao selektivni inhibitor Cox-2 enzima koji katalizira biosintezu prostaglandina, odnosno blokira enzime odgovorne za bol i povišenu tjelesnu temperaturu kod upale.
Proizvod	

2.1.5.2. Omeprazol

Tablica 13. Fizikalno-kemijska svojstva omeprazola [11,17].

Ime	Omeprazol
Struktura	
Naziv po IUPAC-U	6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metansulfinil]-1H-1,3-benzodiazol
Empirijska formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S
M/gmol ⁻¹	345,42
Fragmenti (M ⁺ /najintenzivniji ion)	346/198
CAS broj	73590-58-6
Konstante	logK _{ov} = 1,078 Točka tališta = 155 °C pK _{k1} = 1,2 pK _{k2} = 7,4
Opis	Omeprazol je lijek koji spada u inhibitore protonske pumpe parijetalnih želučanih stanica. Upotrebljava se za liječenje bolesti uzrokovanih pretjeranim lučenjem želučane kiseline te za liječenje sindroma Zollinger-Ellison.
Način djelovanja	Djeluje tako da ireverzibilno blokira enzimski sustav proton/kalij-adenozin trifosfatazu-enzim odgovoran za zadnji korak u izlučivanju želučane kiseline parijetalnih želučanih stanica.
Proizvod	

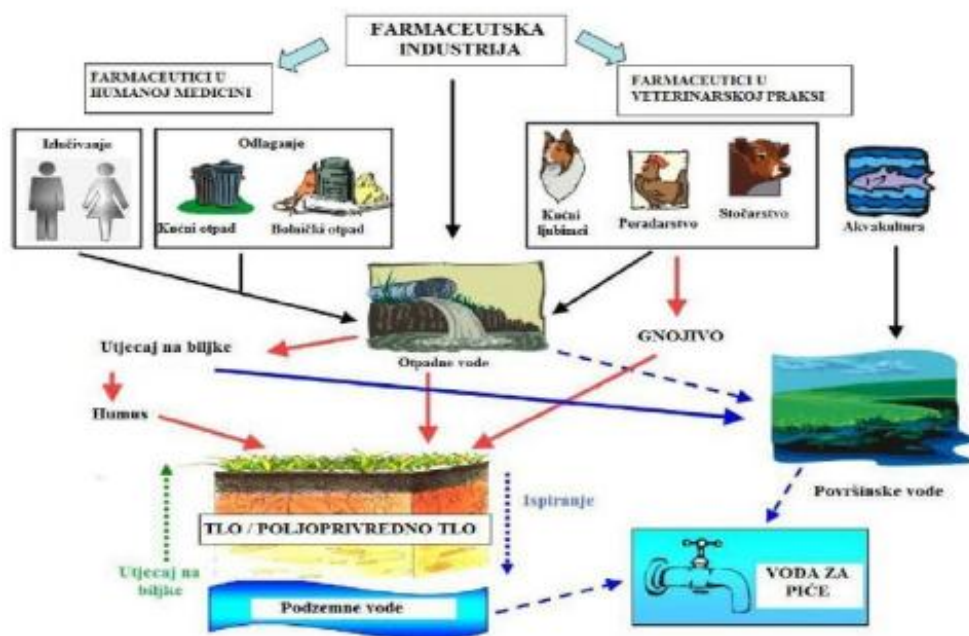
2.2. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Sve do nedavno farmaceutici nisu spadali u skupinu zagađivala opasnih za zdravlje i okoliš, međutim brojna znanstvena istraživanja provedena u zadnjih nekoliko godina pokazala su da su farmaceutici jedna od najrasprostranjenijih molekula u okolišu. Obzirom na provedena istraživanja u kojima je otkriveno prisutstvo farmaceutika u različitim uzorcima vode, tla, sedimenta te industrijskih i komunalnih otpadnih voda ubrajaju se u tzv. „nova zagađivala”.

Upotreba drugih organskih zagađivala, primjerice pesticida, je u padu posljednjih nekoliko godina zahvaljujući zakonima koji su uvedeni kako bi se smanjila njihova upotreba, a time i njihova prisutnost u okolišu. S druge strane, prisutost farmaceutika nije moguće tako smanjiti obzirom na njihov koristan ljudski (i životinjski) zdravstveni učinak te ekonomsku važnost [18].

Povećana potrošnja farmaceutika rezultirala je njihovim kontinuiranim ispuštanjem u okoliš te trajnim zadržavanjem. U okoliš dospijevaju iz raznih izvora često u velikim, ali i vrlo niskim koncentracijama, kao što su ppm (mg/L), ppb (µg/L), ppl (ng/L) što je najčešće nemoguće kvalitativno odrediti klasičnim, ali i modernim metodama. Kako bi se moglo procijeniti ponašanje i sudbina farmaceutika u okolišu važno je poznavati njihove fizikalno-kemijske karakteristike kao i njihovu sklonost procesima razgradnje [19].

Na Slici 2. prikazani su načini dospijevanja farmaceutika u okoliš. Vidljivo je da su ljudske i životinjske izlučevine, urin i izmet, veliki izvor farmaceutika u okolišu. Razlog tome je upravo njihova sposobnost sprječavanja širenja bolesti i ublažavanja bolova. Ujedno, zbog velikog razvoja farmaceutske industrije njihov broj i koncentracija u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama iz dana u dan se drastično povećava. Veliki problem predstavlja i ispuštanje komunalnih otpadnih voda koje uvelike mogu zagađiti podzemne, površinske i pitke vode te tlo i sediment [20].



Slika 2. Putevi unošenja farmaceutika u okoliš [1].

2.2.1. Farmaceutici u sedimentu

Farmaceutici se u sedimentu razgrađuju kao posljedica djelovanja sunčeve svjetlosti te prisustva raznih mikroorganizama i kemikalija u sedimentu. Tendencija razgradnje definira se vremenom poluraspada ($t_{1/2}$). Vrijeme poluraspada je vrijeme potrebno da se razgradi pola od ukupno primijenjene količine farmaceutika. Što je ono dulje to je veća opasnost od njihovog prodiranja u podzemne vode [21].

Farmaceutici koji pokazuju tendenciju sorbiranja na krute matice akumuliraju se u tlu i sedimentima. Izmjena tvari između tekuće i čvrste faze se može opisati koeficijentom sorpcije K_d , koji se definira kao omjer koncentracije tvari sorbirane na sorbensu i koncentracije tvari u vodi pri uspostavljenoj ravnoteži. Mjera sorpcije farmaceutika na organsku tvar iskazuje se koeficijentom sorpcije na organski ugljik, K_{oc} , koji se definira :

$$K_{oc} = K_d * 100/w$$

gdje je : w – maseni udio organskog ugljika u sedimentu

K_d – koeficijent sorpcije

2.3. ODREĐIVANJE FARMACEUTIKA U OKOLIŠU

2.3.1. Priprema uzorka – metoda ekstrakcije [22]

Ekstrakcije su česte u svijetu oko nas. Svaki put kad pripremamo šalicu čaja ili lonac kave obavljamo postupak kemijske ekstrakcije. Ekstrakcija je potpuno ili djelomično odvajanje smjese tvari na temelju različitih topljivosti u pojedinim otapalima. Ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Bilo da se radi o ekstrakciji iz tekuće (ekstrakcija tekuće-tekuće) ili iz čvrste faze (ekstrakcija čvrsto-tekuće), organsko otapalo koje se primjenjuje za ekstrakciju treba zadovoljiti sljedeće uvjete:

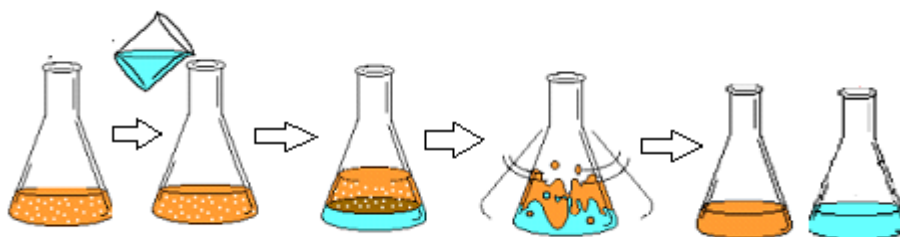
- otapalo mora biti kemijski inertno prema prisutnim tvarima koje ekstrahiramo
- tvar koja se ekstrahira mora imati što bolju topljivost u tom otapalu
- otopina iz koje ekstrahiramo željenu tvar i otapalo moraju se što više razlikovati u gustoći
- otapalo ne smije imati previsoko vrelište kako bi se nakon ekstrakcije moglo lako ukloniti
- otapalo mora biti što manje zapaljivo i otrovno te jeftino

Izbor metode ekstrakcije ovisi o strukturi, molekularnim masama, polarnosti, topljivosti, pK_k vrijednostima i drugim svojstvima komponenti koje želimo izolirati ili razdvojiti.

2.3.1.1. Ekstrakcija tekuće-tekuće [23]

Ova vrsta ekstrakcije temelji se na razdiobi tvari između dva otapala koja se ne miješaju. Uspjeh same ekstrakcije ovisi o razlici u topljivosti tvari u različitim otapalima.

Postupak ekstrakcije tekuće-tekuće prikazan je na Slici 3. Pripremi se otopina uzorka u pogodnom otapalu i pomoću kemijske reakcije se uspostavi maksimalna razlika u topljivosti između dviju faza. Zatim se doda drugo nemiješajuće otapalo radi uspostave dvofaznog sustava. Smjesa se miješa do uspostave ravoteže među fazama te nakon toga slijedi njihovo razdvajanje.



Slika 3. Ekstrakcija tekuće-tekuće

2.3.1.2. Ekstrakcija čvrsto-tekuće [24]

Ekstrakcija čvrsto-tekuće može se provoditi na razne načine (mućkanjem u mehaničkim mućkalicama, Soxhlet ekstrakcijom ili automatiziranom Soxhlet ekstrakcijom). Najčešće korištena metoda ekstrakcije je Soxhlet ekstrakcija. Soxhlet aparatura je dizajnirana tako da kad se komora koja drži cilindar napuni do određenog volumena otapalo koje sadrži ekstrahirane komponente ispušta se pomoću sifonske cijevi u tikvicu koja sadrži otapalo i proces se ponavlja sve dok se analit uspješno ukloni iz čvrstog uzorka.

Svi ovi postupci su dosta spori te zahtijevaju veliku količinu uzoraka i otapala za potpunu ekstrakciju analita. Upravo iz tog razloga dolazi do razvoja novijih, modernijih metoda ekstrakcije koje su uvelike povećale produktivnost i ubrzale brojne analize. Neke od najmodernijih metode ekstrakcije čvrsto-tekuće su: ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija mikrovalovima te ubrzana ili poboljšana ekstrakcija otapalom.

2.3.1.2.1. Ekstrakcija superkritičnim fluidom [25,26]

Superkritični fluid nastaje kada se plin ili kapljevinu zagrijava na temperaturu iznad kritične, pri čemu je i tlak iznad kritičnog. Fluidi su pokazali mnogo bolja ekstrakcijska svojstva jer kroz čvrstu fazu prolaze poput plinova, dok analit otapaju poput otapala. Najčešće korišten plin je CO_2 jer ima sposobnost jednostavnog postizanja superkritičnih uvjeta. Ova vrsta ekstrakcije našla je široku primjenu u analizi okoliša i hrane.

2.3.1.2.2. Ekstrakcija mikrovalovima [27]

Mikrovalovi su elektromagnetski valovi frekvencije 0,3-300 GHz. Mikrovalna ekstrakcija temelji se na zagrijavanju otapala i uzoraka koji su u kontaktu, djelovanjem mikrovalova. Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Upotrebom mikrovalnog zračenja može se izbjeći i razgradnja uzorka zbog visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matrice.

2.3.1.2.3. Ubrzana ili poboljšana ekstrakcija otapalom [27]

Velika učinkovitost ekstrakcije postiže se uporabom organskog otapala u tekućoj fazi na temperaturama iznad temperature vrelišta otapala. Povišena temperatura povećava brzine difuzije, topljivosti analita i time ubrzava ekstrakciju. Glavni nedostaci metode su što je nakon ekstrakcije potrebno dodatno čišćenje ekstrakta i što je kod visokih temperatura moguća razgradnja nestabilnih analita.

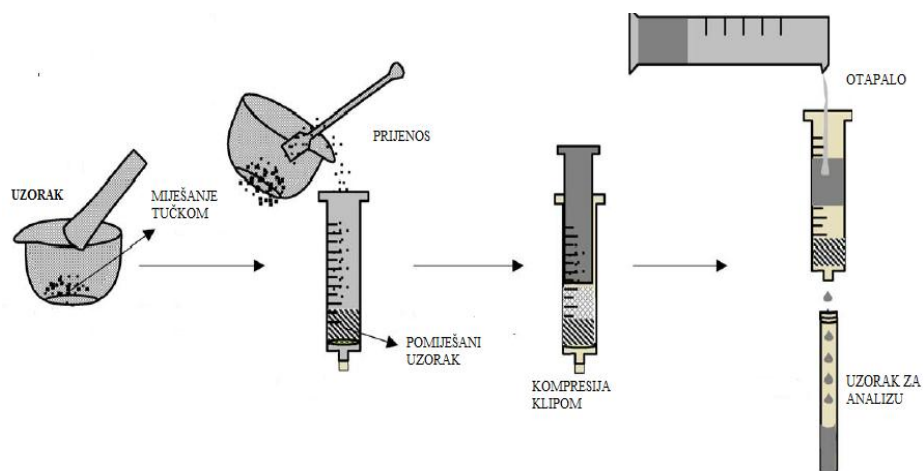
2.3.1.2.4. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD) [28,29]

Metoda raspršenja matice uzorka, MSPD razvijena je 1989.-te za izolaciju lijekova i drugih zagađivala iz hrane, sedimenta, tla i slično. Ova metoda pogodna je za čvrste, polučvrste i viskozne matice.

Postupak MSPD metode temelji se na miješanju male mase ispitivanog uzorka s puno većom masom sorbensa. Najčešće korišteni sorbensi su: florisil, Al_2O_3 , C8 ili C18- vezni silikagel jer zahvaljujući svojim svojstvima omogućuju dobro raspršenje.

Nakon miješanja ispitivanog uzorka i sorbensa pune se kolonice te se željeni analiti eluiraju raznim otapalima kao što je vidljivo na Slici 4.

Miješanjem i raspršenjem uzorka preko sorbensa povećava se površina na kojoj se odvija ekstrakcija. Sve nečistoće zadržavaju se na sorbensu, a kroz kolonicu prolazi čisti uzorak. Time dolazi do istovremenog pročišćavanja uzorka i ekstrakcije, smanjenja količine potrebnog otapala i vremena analize.



Slika 4. Koraci u MSPD ekstrakciji [29]

MSPD metoda smatra se vrlo učinkovitom metodom sorpcije i ekstrakcije jer se za razliku od ostalih, tradicionalnih ekstrakcija odlikuje: brzinom, jednostavnošću, malim troškovima i blagim ekstrakcijskim uvjetima. Zahvaljujući svemu tome koristi se za izolaciju širokog raspona lijekova, pesticida i drugih raznih spojeva.

2.3.2. Kromatografska analiza farmaceutika

Kromatografija je analitička metoda odvajanja koja se zasniva na različitoj raspodjeli komponenti uzorka između dvije faze od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Nepokretna faza može biti čvrsta ili tekuća, dok pokretna može biti tekuća ili plinovita. Komponente se pod utjecajem pokretne faze kreću kroz nepokretnu fazu različitom brzinom i tako se razdvajaju. Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi ispitivanog spoja, vrsti veze u ispitivanom spoju, kromatografskoj podlozi i prirodi ravnoteže kromatografskog procesa. Obzirom na sastav pokretne faze kromatografske tehnike dijele se na: plinsku kromatografiju, tekućinsku kromatografiju te fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima [30].

2.3.2.1. Tekućinska kromatografija [30]

U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti razni sorbensi. Izbor pogodnog otapala ovisi o njegovoj sposobnosti stvaranja vodikovih veza. Najbitnije svojstvo otapala u tekućinskoj kromatografiji je da su ona kromatografski čista jer bi nečistoće u otapalima uvelike mogle remetiti kromatografsku analizu.

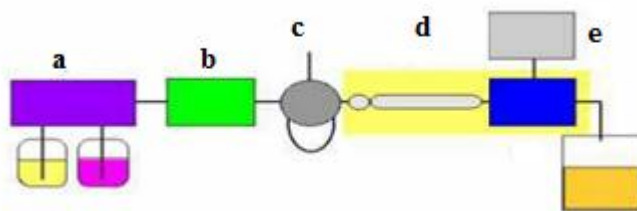
Tekućinska kromatografija dijeli se na:

- adsorpcijsku kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza adsorbens
- razdijelnu kromatografiju pri kojoj je nepokretna faza kapljevina nanescena na čvrsti inertni nosač

2.3.2.1.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti [31,32]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC) razvijena je 1960. godine iz razloga što je klasična tekućinska kromatografija imala brojne nedostatke, kao što su: velike kolone, spor protok te dugo vrijeme odjeljivanja.

HPLC je vrsta kromatografije na stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti smjese na temelju kemijsko-fizikalnih interakcija između analita, tekuće pokretne faze i čvrste nepokretne faze u stupcu. Na Slici 5. prikazana je shema HPLC uređaja.



Slika 5. Shematski prikaz HPLC uređaja

Gdje je : **a-** kontrola udjela komponenti pokretne faze

b- pumpa

c- uređaj za unošenje uzorka

d- kolona/pretkolona

e- detektor

Otapala koja se koriste trebaju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova i suspendiranih čestica. U sustavu mogu biti jedan ili više spremnika pokretne faze koji služe za skladištenje otapala iz kojega crpka kontinuirano vuče određeni volumen određenog otapala. Između spremnika i crpke su cjevčice kojima su one povezane. Crpka sadrži filter koji sprječava moguć unos čestica i onečišćenja u crpku. Konstantan protok pokretne faze u sustavu omogućava upravo crpka, koja radi pri jako visokim tlakovima. Protok može biti izokratan (sastav pokretne faze je stalan) ili gradijentan (ukoliko se tijekom analiziranja mijenja sastav pokretne faze). Uređaj za unošenje uzorka unosi ga u pokretnu fazu prije njenog ulaska u kolonu. Iz bočica za uzorke unosi se točno određeni volumen zadan programom. Kolona je najčešće uska metalna cijev u kojoj se nalazi nepokretna faza. Dimenzije kolone, duljina i unutarnji promjeri, mogu biti različite. Duljina kolone može biti od 100 mm do 250 mm, a promjer kolone od 2 mm do 4,6 mm. Analizirana tvar ili smjesa tvari prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom. U pokretnu fazu unosi se jako mali volumen uzorka, te se zbog specifičnih kemijskih interakcija, sastava pokretne i nepokretne faze i prirode analizirane tvari komponente smjese različito zadržavaju na koloni.

Na detektoru se mjere promjene svojstava analita ili pokretne faze. Najčešće se kao detektori koriste UV/VIS spektrofotometar, fluorimetar, elektrokemijski detektor ili spektrometar masa.

Svaki detektor je specifičan i razlikuje se u radu jedan od drugog, ali svi daju signal koji je proporcionalan nekom određenom svojstvu analita. Računalom se upravlja HPLC sustavom, mogu se mijenjati i kontrolirati određeni parametri, a prikupljeni podaci mogu se dodatno obrađivati.

2.3.2.1.2. Kromatografski parametri [30]

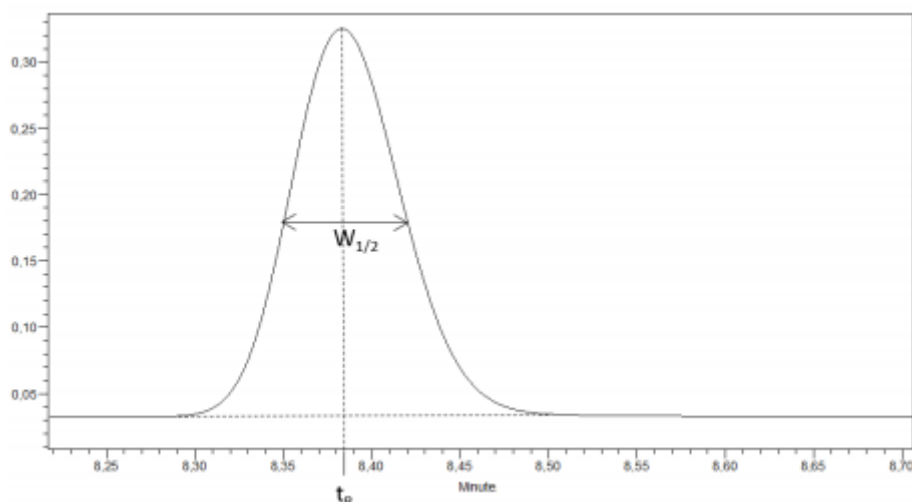
Ideal svakog mjerenja jest dobiti rezultate sa što manjom nesigurnosti u što kraćem vremenu. Pri optimizaciji HPLC metode postoji niz parametara koje valja optimirati kako bi se dobili što točniji rezultati. Neki od najvažnijih parametara su: vrijeme zadržavanja, rezolucija, omjer visine kromatografske krivulje i šuma, efikasnost kolone, preciznost i ponovljivost [33].

Svaku kromatografsku krivulju karakterizira vrijeme zadržavanja (t_R) i širina kromatografske krivulje na polovici visine ($w_{1/2}$) kao što je vidljivo na Slici 6. Vrijeme zadržavanja jest vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru smještenom na izlasku iz kromatografske kolone.

$$t_R = t_m + t_{R'}$$

gdje je : t_m - zadržano vrijeme, tj. vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz nju

$t_{R'}$ - vrijeme zadržavanja koje otopljena tvar provede vezana za nepokretnu fazu



Slika 6. Vrijeme zadržavanja (t_R) i širina kromatografske krivulje ($w_{1/2}$)

Djelotvornost kolone može se kvantitativno izraziti brojem i visinom teorijskih tavana, a raste povećanjem broja tavana (N) i smanjenjem visine tavana (h). Parametri procjene djelotvornosti kolone su razlučivanje (R_s), separacijski faktor (α), simetrijski faktor (A_s) i omjer vrha i podnožja kromatografske krivulje.

Razlučivanje kolone je kvantitativna mjera koja izražava sposobnost odjeljivanja dvaju sastojaka. Može se poboljšati produženjem kolone i povećanjem faktora kapaciteta.

$$R_s = \frac{2[t_{RB} - t_{RA}]}{w_A + w_B}$$

gdje je : t_{RB} - vrijeme zadržavanja jedne komponente

t_{RA} - vrijeme zadržavanja druge komponente

w_A i w_B - bazne širine pikova prve i druge komponente

Separacijski faktor (α) – pokazuje moć odijeljivanja sastojaka na koloni (uvijek je veći od 1)

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M}$$

gdje je: t_{RB} - vrijeme zadržavanja jedne komponente

t_{RA} - vrijeme zadržavanja druge komponente

t_M - zadržano vrijeme

Parametri preciznosti određivanja su omjer signala i šuma te ponovljivost (RSO%). Jednadžbe parametara djelotvornosti i preciznosti prikazane su u Tablici 14.

Tablica 14. Prikaz kromatografskih parametara i njihovih jednadžbi [30]

Parametri	Jednadžbe
Broj teorijskih tavana (N)	$N = 5.54 \cdot \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2$
Visina teorijskih tavana (h)	$h = \frac{L}{N}$
Omjer signala i šuma	$s/n = \frac{2H}{n}$
Ponovljivost (RSD%)	$RSD\% = \frac{s}{\bar{x}} \cdot 100$

Vrijeme zadržavanja ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima tvari koja se analizira, nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze. Pokretna faza može biti voda, pufer, organsko otapalo ili smjesa otapala, pri čemu je bitno da otapala budu visoke čistoće. Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografske separacije ovisi o duljini kolone, promjeru čestica punjenja, radnom tlaku i temperaturi. Nakon prolaska kroz kolonu, uzorak dolazi na detektor koji prati svojstva uzorka i na taj način moguće je provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu.

2.4. VALIDACIJA ANALITIČKIH METODA

Kako bi za određenu metodu mogli reći da je pouzdana potrebno je dati točnu informaciju o analiziranom uzorku. Validacijom se pokušava optimizirati mjerni postupak i neželjene pogreške svesti na minimum.

2.4.1. Osnovni parametri validacije [33]

Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu, a kako bi se validirao analitički sustav potrebno je provesti vrednovanje svih njegovih bitnih koraka.

Osnovni validacijski parametri koji se provode tijekom validacije analitičkog sustava su:

- selektivnost/specifičnost
- linearnost
- osjetljivost
- granica detekcije
- granica kvantifikacije
- preciznost
- točnost
- otpornost
- radno područje

Selektivnost/specifičnost

Selektivnost je mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih uzoraka koji primjenom metoda ne smetaju, a specifičnost je svojstvo metode da identificira ili kvantificira željeni analit nakon uklanjanja smetnji koje bi mogle utjecati na rezultat.

Linearnost

Linearnost metode je svojstvo metode da unutar određenog koncentracijskog područja pokazuje linearnu ovisnost odziva o koncentraciji analita u ispitnom uzorku.

Osjetljivost

Osjetljivost je svojstvo metode ili instrumenta da razlikuje uzorke različitih koncentracija analita uz definiranu razinu pouzdanosti.

Granica detekcije

Granica detekcije je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati, ali ne i kvantificirati.

Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije je najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz odgovarajuću preciznost i točnost.

Preciznost

Preciznost je stupanj podudaranja više nezavisnih ispitnih rezultata izvedenih iz istog homogenog uzorka u propisanim uvjetima. Pod preciznost također spadaju ponovljivost i obnovljivost.

Ponovljivost je informacija koja nam govori koliko ponovljenih mjerenja možemo napraviti kako bismo postigli željenu razinu preciznosti. Metoda je ponovljiva ako pri istim mjernim uvjetima (isti analitičar, isti postupak, isti instrument,...) osigurava dozvoljenu bliskost dobivenih rezultata. Obnovljivost je informacija koja nam govori o bliskosti rezultata ponovljenih mjerenja analita pri različitim mjernim uvjetima.

Točnost

Točnost je stupanj podudaranja između mjerene i prave vrijednosti uzrokovana uglavnom sustavnom pogreškom.

Otpornost

Otpornost je svojstvo metode da ne reagira na male promjene njenih parametara.

Radno područje

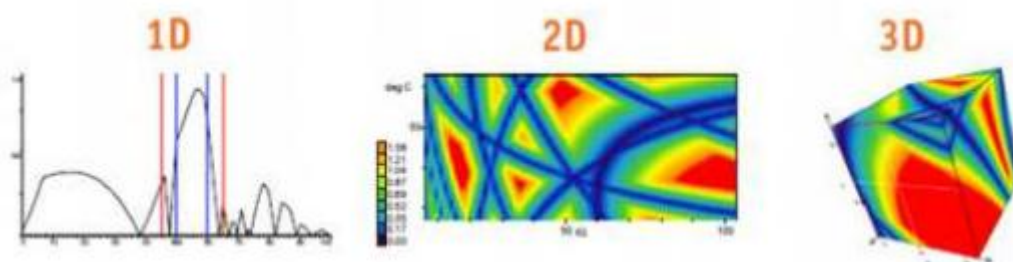
Radno područje je dio tj. interval unutar kojeg metoda ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost.

2.5. DryLab metoda

Kako bi se ubrzale analize, poboljšale efikasnosti, te dobilo više specifičnih podataka o metodama, razvili su se brojni softveri. Jedan od njih je DryLab (Molnar Institute, Berlin, Njemačka). To je računalni program na temelju kojeg se predviđaju kromatografska ponašanja na jednoj nepokretnoj fazi. DryLab smanjuje potrebno vrijeme za optimizaciju metode u nekim rutinskim primjenama i pruža informacije o promjenama faktora (temperatura-Tg, vremenski gradijent-Tg, pH-vrijednost) prilikom kromatografskih analiza.

Parametri koji se najčešće ugađaju u softveru su temperatura, vrijeme i pH-vrijednost pokretne faze. Rezultat mijenjanja navedenih parametara je trodimenzijski prikaz ovisnosti jednog parametra o druga dva. S obzirom na broj parametara koji se želi modificirati dobiju se

grafički prikazi u funkciji jednog parametra, 1D (kritična vrijednost parametra na y-osi), dva parametra, 2D (kritična vrijednost parametra predstavljena površinom odgovarajuće boje na dvodimenzionalnu grafu), ili tri parametra, 3D, gdje se dobije kocka čija površina predstavlja kritičnu vrijednost parametra [34].



Slika 7. Grafički prikaz 1D, 2D i 3D kritičnih rezolucija [34]

3.EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Sediment

Optimizacija postupka ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta raspršenjem matice sedimenta kroz čvrstu fazu napravljena je na uzorku sedimenta rijeke Petrinjčice iz Sisačko-moslavačke županije, Republika Hrvatska, za koji se pouzdano zna da nije zagađen nikakvim farmaceuticima.

3.1.2. Kemikalije

U Tablici 15. navedene su kemikalije koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada.

Naziv	Molekulaska formula	Čistoća	Proizvođač
Metanol	CH ₃ OH	HPLC Grade	J. T. Baker, Nizozemska
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	<i>p.a.</i>	Kefo, Ljubljana
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC Grade	Fisher Chemical, SAD
Aceton	C ₃ H ₆ O	<i>p.a.</i>	Gram – mol, Zagreb
Etil-acetat	C ₄ H ₈ O ₂	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
1-propanol	C ₃ H ₈ O	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
2-propanol	C ₃ H ₈ O	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
Heksan	C ₆ H ₁₄	<i>p.a.</i>	Sigma – Aldrich
Dietil-eter	C ₄ H ₁₀ O	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb
Toluen	C ₇ H ₈	<i>p.a.</i>	Kemika, Zagreb

3.1.3. Sorbens

U ovom radu korišten je SampliQ C18 ODS sorbens proizvođača Agilent Technologies. C18 je kemijski modificirani silikagel dobrih lipofilnih svojstava koja omogućuju dobro raspršenje i zadržavanje lipofilnih vrsta.

3.1.4. Farmaceutici

Farmaceutici korišteni u ovom radu su prikazani u Tablici 16.

Tablica 16. Popis korištenih farmaceutika

Farmaceutik	CAS broj	Molekularna težina	Proizvođač
Albendazol	54965-21-8	265,333	Veterina
Prazikvantel	55268-74-1	312,411	Veterina
Febantel	58306-30-2	446,49	Veterina
Levamisol	14769-73-4	204,292	Veterina
Azitromicin	83905-01-5	748,984	Pliva
Tiamulin	55297-95-5	493,742	Veterina
Sulfametazin	57-68-1	278,33	Veterina
Linezolid	165800-03-3	337,346	Pliva
Imatinib	152459-95-5	493,603	Pliva
Torasemid	56211-40-6	348,421	Pliva
Etodolak	41340-25-4	287,35	Pliva
Omeprazol	73590-58-6	345,42	Pliva
Sulfafurazol	127-69-5	267,304	Veterina

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Analitička vaga

U ovo eksperimentu korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU (Slika 8.), maksimalnog kapaciteta 120 g.



Slika 8. Analitička vaga XA105DU

3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Tijekom pripremanja standardnih otopina farmaceutika u odmjernim tikvicama, svaka tikvica se nakratko uronila u ultrazvučnu kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (Slika 9.), kako bi se poboljšao proces otapanja farmaceutika u smjesi otapala.



Slika 9. Ultrazvučna kupelj

3.2.3. Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom

Za ekstrakciju uzorka kroz čvrstu fazu korištena je Supelco Visiprep 24 aparatura prikazana na Slici 10. Aparatura se sastoji od vakuum pumpe i posude s poklopcem na koji se može istovremeno staviti do 24 kolonice. Poklopac aparature ima jedinstvenu kontrolu protoka ventilima koji omogućuju vrlo jednostavnu kontrolu kroz svaku SPE cijev. Ventili u poklopcu usmjeravaju uzorak u staklenu kiveticu.



Slika 10. Aparatura za ekstrakciju uzorka kroz čvrstu fazu

3.2.4. Rotacijski uparivač

Uzorci su uparivani na rotacijskom uparivaču Rotavapor R-114/A, Büchi (Slika 11.), pri sniženom tlaku koji se postiže pomoću vakuum sisaljke. Rotacijski uparivač se sastoji od 34 jedinice za rotiranje tikvice s ekstraktom, vodene kupelji, povratnog hladila i tikvice za prikupljanje kondenzata.



Slika 11. Rotacijski uparivač

3.2.5. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Analiza uzoraka provedena je na UHPLC Agilent Series 1290 uređaju koji ima vakuumski degazer, automatski dodavač uzorka, termostatski blok i binarnu pumpu te je spojen na spektrometar masa Agilent 6490 Triple Quad MS (Slika 12). Korištena je WATERS Acquity CSH C18 kolona. Dimenzije kolone su 100×2,1 mm, a promjer čestica unutar kolone je 1,7 µm.



Slika 12. UHPLC Agilent Series 1290

3.3. OPIS RADA

3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Temeljna standardna otopina (TSO) trinaest ispitivanih uzoraka pripremljena je vaganjem standarda na analitičkoj vagi (1,00 mg svakog) te su kao takvi kvantitativno preneseni u odmjernu tikvicu od 10 mL i otopljeni u metanolu. Kako bi se potpuno otopili, TOS je kratko stavljena na ultrazvučnu kupelj. Iz temeljne standardne otopine (100 mg/L) potom su rađene potrebne radne otopine koje su zajedno sa TSO-om čuvane na temperaturi do 4 °C.

3.3.2. Postupak ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu

Sediment za analizu se priprema na način da se na 2 g sedimenta doda 2 mL TSO ispitivanih farmaceutika i tada se tako pripremljen sediment ostavi neko vrijeme kako bi otapalo isparilo. Nakon toga, izvaže se 50 mg sedimenta i 100 mg sorbenta C₁₈, dobivena smjesa se homogenizira u tarioniku i tom smjesom se pune prazne kolonice, u koje je prethodno stavljena prva fritra na dno. Na kraju se stavi druga fritra i sve se dobro sabije. Tako dobivene kolonice spremne su za eluiranje otapalom. Otapalo se dodaje prvo u volumenu od 1 mL pri

čemu se pričekava 5 min da se kolonica dobro navlaži s otapalom, a zatim se pusti da otapalo prođe kroz kolonu. Postupak se ponavlja još dva puta, ali s volumenom od 2 mL. Svi ekstrakti hvataju se zajedno u jednu kiveticu. Svaki eksperiment se radi u tri paralelne serije uz slijepu probu koja sadrži uzorak sedimenta bez dodatka TSO farmaceutika. Dobiveni ekstrakt se promiješa kapaljkom te se prenosi u vijalice za snimanje na UHPLC-u.

U prvom nizu eksperimenata ispitivana je iskoristivost ekstrakcije smjese 13 farmaceutika na C18 sorbentu s različitim čistim otapalima za eluiranje (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, aceton, etil-acetat, acetonitril, diklormetan, dietileter, voda i heksan) kao i s raznim kombinacijama spomenutih otapala uz volumen otapala za eluiranje od 5 mL. Po pronalasku optimalne smjese otapala za eluiranje, mijenjao se i volumen otapala za eluiranje (5, 7 i 9 mL).

Nakon pronalaska optimalnih uvjeta razvijena metoda je validirana te se pristupilo analizi realnih uzoraka. Zbog toga što su realni uzorci tla i sedimenta možda sadržavali i neke farmaceutike obuhvaćene ovom metodom, kao i spojeve koji nisu bili uključeni u ovo istraživanje, masena koncentracija farmaceutika u realnom uzorku je određena metodom standardnog dodatka u tri koncentracijske točke (jedna bez dodatka standarda i dvije s dodatkom standardne otopine farmaceutika u realni uzorak), što je i jedan od načina za isključenje utjecaja matrice na analitički rezultat.

3.3.3. Analiza uzoraka pomoću tekućinskog kromatografa ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Prethodno pripravljeni uzorci analizirani su na UHPLC instrument, Agilent Series 1290 spojen sa spektrometrom masa 6490 Triple Quad MS.

Do optimalne kromatografske metode za analiziranje dobivenih ekstrakata došlo se primjenom DryLab računalnog programa. Provela su se četiri eksperimenta, gdje se mijenjala temperatura kolone i vrijeme trajanja analize. Pokretna faza sastojala se od 0,1% mravlja kiselina u vodi (A) i 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje, a nepokretna faza je bila kromatografska kolona WATERS Acquity CSH C18; 100x2,1 mm; 1,7 µm. Svaka analiza provedena je pri sljedećim uvjetima izvora iona spektrometra masa (Tablica 17.)

Tablica 17. Uvjeti izvora iona spektrometra masa

Temperatura plina	250 °C
Protok plina	15 L/min
Tlak raspršivača plina	20 psi
Plinski plamenik	400
Plinski protok	12
Napon kapilare	4500 V

Nakon niza eksperimenata dobivena je optimalna kromatografska metoda čiji je gradijent pokretne faze u Tablici 18.:

Tablica 18. Gradijent pokretne faze

Vrijeme, min	Udio otapala A/B u pokretnoj fazi, %
0	90/10
9	30/70

Uzorci su u kromatografski sustav injektirani redosljedom: slijepi uzorak, standardna otopina smjese farmaceutika te ekstrakti. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Hunter. Ispitivani farmaceutici identificirani su na temelju masenih spektara i vremena zadržavanja prikazanih u Tablici 19.

Kvantitativna analiza provodila se integriranjem kromatograma, odnosno očitavanjem površine ispod odgovarajuće kromatografske krivulje za svaki farmaceutik. Nakon očitavanja površina ispod krivulja uspoređivale su se vrijednosti površina standardnih otopina i dobivenih ekstrakata te se odredila iskoristivost i relativno standardno odstupanje za svaki farmaceutik pojedinačno.

Tablica 19. Fragmentacija ispitivanih farmaceutika

Farmaceutik	Vrijeme zadržavanja,min	Ciljani ion (m/z)	Potvrđni ion (m/z)	Fragmentor	Energija sudara
Azitromicin	4,3	750	158	380	30
Tiamulin	6,7	494	394	380	30
Imatinib	3,4	494	192	380	25
Febantel	8,6	447	415	380	10
Torasemid	5,2	349	264	380	10
Omeprazol	3,6	346	198	380	10
Linezolid	3,9	338	296	380	25
Prazikvantel	7,3	313	203	380	10
Etodolak	8,2	288	172	380	10
Sulfametazin	1,7	279	186	380	10
Sulfafurazol	4,4	268	156	380	30
Albendazol	5,7	266	234	380	25
Levamisol	0,8	205	178	380	25

4.REZULTATI I RASPRAVA

4.1. EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ SEDIMENTA RASPRŠENJEM KROZ ČVRSTU FAZU

Najvažniji korak u razvoju metode je priprema uzorka. Kod ekstrakcije raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu najvažniji korak je odabir sorbensa i otapala. Odabir sorbensa ovisi o samom analitu, njegovoj prirodi te fizikalno-kemijskim karakteristikama.

Obzirom da je eksperiment proveden na 13 različitih farmaceutika koji se međusobno jako razlikuju pravi je izazov provesti optimizaciju metode njihovog određivanja te pronaći optimalne uvjete za njihovu ekstrakciju.

U svim eksperimentima korišten je sorbens C18 zbog svojih dobrih lipofilnih svojstava.

U prvom nizu eksperimenata ekstrakcija je provedena s čistim otapalima, čiji je volumen iznosio 5 mL. Korištena otapala su: acetonitril, aceton, etanol, etil-acetat, diklormetan, 1-propanol, 2-propanol, voda, heksan i dietil eter. U Tablicama 20A, 20B i 20C i na Slici 13 prikazana su iskorištenja ispitivanih farmaceutika ostvarena primjenom navedenih otapala. Prema tablicama i slikama vidimo da su iskorištenja različita za svaki farmaceutik no može se izdvojiti par otapala pri kojima su iskorištenja uglavnom dobra za većinu ispitivanih farmaceutika. Kao dobra otapala za ovu skupinu farmaceutika pokazali su se: aceton, acetonitril, metanol, etanol i 1-propanol. Otapala kod kojih su dobivena iskorištenja najmanja su: diklormetan i dietileter. Ostala otapala pokazuju srednje iskorištenje.

Tablica 20A. Iskorištenje farmaceutika primjenom različitih otapala

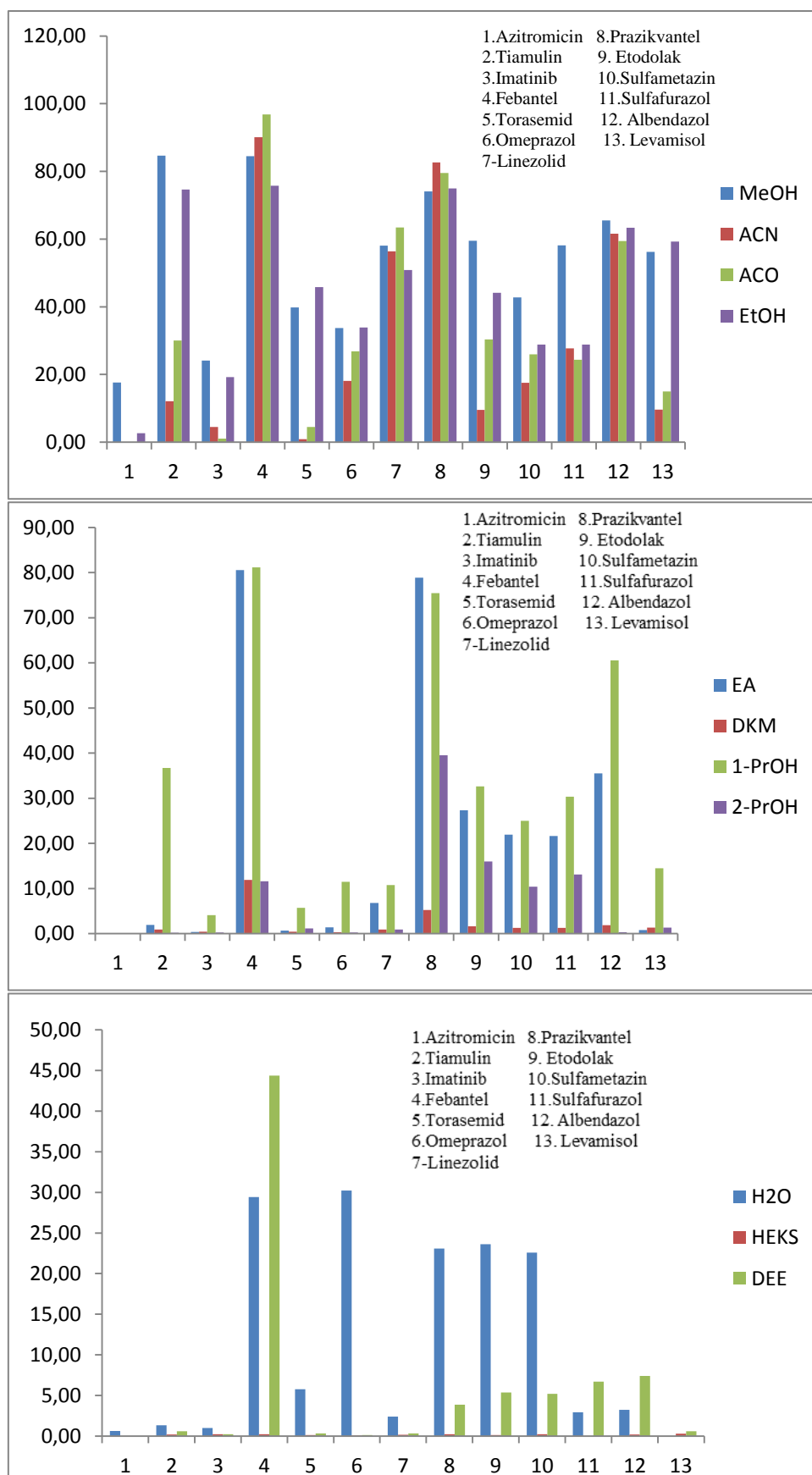
	I / %			
	MeOH	ACN	ACO	EtOH
Azitromicin	17,59 ± 7,12	-	-	2,67±5,80
Tiamulin	84,61±8,89	12,10±18,94	30,07±1,69	74,67±9,10
Imatinib	24,15±15,06	4,49±26,80	1,03±0,66	19,23±18,16
Febantel	84,47±11,18	90,07±4,58	96,81±9,87	75,80±6,90
Torasemid	39,79±9,75	0,87±27,18	4,48±4,49	45,86±10,70
Omeprazol	33,74±11,79	18,08±1,53	26,84±12,71	33,89±7,99
Linezolid	58,10±11,14	56,36±7,10	63,46±13,27	50,88±4,67
Prazikvantel	74,05±3,53	82,65±3,86	79,56±8,76	74,94±11,04
Etodolak	59,49±2,08	9,54±11,67	30,35±15,08	44,11±16,81
Sulfametazin	42,80±14,61	17,59±45,13	25,96±10,67	28,83±18,19
Sulfafurazol	58,15±1,00	27,68±19,13	24,33±12,47	28,84±12,93
Albendazol	65,48±4,52	61,57±4,05	59,45±13,54	63,34±15,44
Levamisol	56,24±5,19	9,60±13,98	15,03±4,56	59,27±6,98

Tablica 20B. Iskorištenje farmaceutika primjenom različitih otapala

	I / %			
	EA	DKM	1-PrOH	2-ProH
Azitromicin	-	-	-	-
Tiamulin	1,93±5,00	0,89±1,92	36,71±11,23	0,17±6,98
Imatinib	0,36±38,91	0,45±44,88	4,11±27,31	0,24±3,59
Febantel	80,52±3,87	11,93±10,04	81,17±5,37	11,62±102,81
Torasemid	0,68±12,16	0,45±2,40	5,74±8,00	1,18±2,34
Omeprazol	1,37±15,60	0,33±19,58	11,47±16,87	0,28±33,20
Linezolid	6,80±9,54	0,86±0,62	10,74±7,04	0,94±1,76
Prazikvantel	78,85±4,52	5,23±11,04	75,45±7,06	39,51±0,89
Etodolak	27,33±4,37	1,66±6,27	32,63±4,67	15,98±13,90
Sulfametazin	21,95±5,79	1,28±10,71	24,97±4,62	10,38±11,75
Sulfafurazol	21,64±2,97	1,31±11,16	30,36±2,56	13,12±3,70
Albendazol	35,50±11,36	1,89±11,72	60,55±2,78	0,30±4,22
Levamisol	0,80±6,36	1,32±3,05	14,47±7,13	1,36±0,60

Tablica 20C. Iskorištenje farmaceutika primjenom različitih otapala

	I / %		
	H ₂ O	HEKS	DEE
Azitromicin	-	-	-
Tiamulin	0,62±9,68	0,18±18,60	0,61±10,53
Imatinib	1,34±61,01	0,23±1,47	0,24±9,15
Febantel	1,00±5,22	0,24±20,08	44,36±9,44
Torasemid	29,43±5,80	0,13±16,94	0,33±16,93
Omeprazol	5,78±10,41	0,08±0,10	0,14±28,04
Linezolid	30,23±1,48	0,15±7,44	0,32±8,52
Prazikvantel	2,40±4,66	0,24±15,71	3,88±4,64
Etodolak	23,09±5,62	0,12±13,96	5,38±16,43
Sulfametazin	23,61±0,93	0,23±2,06	5,20±13,88
Sulfafurazol	22,58±1,18	-	6,70±13,78
Albendazol	2,92±9,06	0,20±9,44	7,42±10,34
Levamisol	3,22±8,07	0,28±8,47	0,59±6,17



Slika 13. Iskorištenja farmaceutika primjenom različitih otapala

Od izabranih otapala vidljivo je da se najmanje iskorištenje svih farmaceutika ostvaruje primjenom diklormetana (<10%) i heksana (<5%). Nadalje, iz grafova je vidljivo da se najveća iskorištenja ostvaruju s metanolom i acetonom (za gotovo sve farmaceutike >50%). Azitromicin pokazuje najmanje iskorištenje primjenom svih otapala i ono je manje od 20%.

Na osnovi poznavanja iskorištenja ispitivanih farmaceutika primjenom čistih otapala za daljnje eksperimente pomiješani su acetonitril, etanol i metanol s vodom. Korišteni su razni omjeri otapala i vode (6:4, 7:3, 8:2) te se pratilo iskorištenje. Primjenjeni volumen za svaku smjesu otapalo/voda bio je i dalje 5 mL. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 21 - 23 i na Slikama 14 - 16.

Tablica 21. Iskorištenje farmaceutika primjenom acetonitrila i vode u raznim omjerima

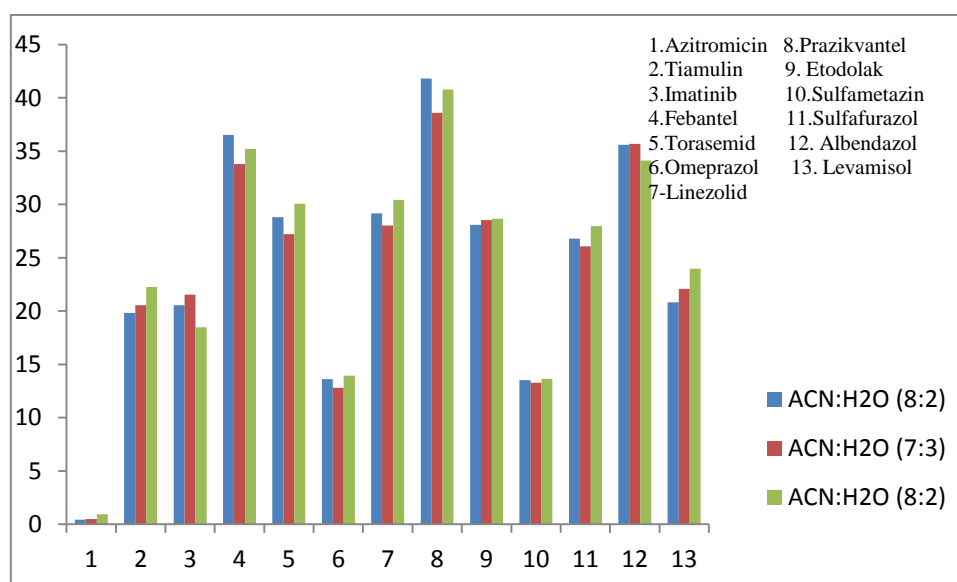
	I / %		
	ACN:H ₂ O (6:4)	ACN:H ₂ O (7:3)	ACN:H ₂ O (8:2)
Azitromicin	0,42±8,59	0,48±1,55	0,93±9,88
Tiamulin	19,82±3,78	20,55±7,13	22,25±4,14
Imatinib	20,53±2,34	21,55±5,34	18,48±7,26
Febantel	36,51±2,28	33,8±5,74	35,2±0,71
Torasemid	28,81±2,62	27,21±7,43	30,06±2,76
Omeprazol	13,61±2,58	12,81±9,31	13,95±1,27
Linezolid	29,15±0,17	28,01±9,83	30,41±2,65
Prazikvantel	41,8±1,58	38,58±9,60	40,79±3,54
Etodolak	28,09±4,72	28,54±6,16	28,64±2,47
Sulfametazin	13,51±3,26	13,27±9,93	13,63±0,99
Sulfafurazol	26,79±3,50	26,08±4,18	27,95±2,13
Albendazol	35,58±1,86	35,68±6,51	34,13±0,62
Levamisol	20,82±3,15	22,08±7,23	23,96±2,70

Tablica 22. Iskorištenje farmaceutika primjenom etanola i vode u raznim omjerima

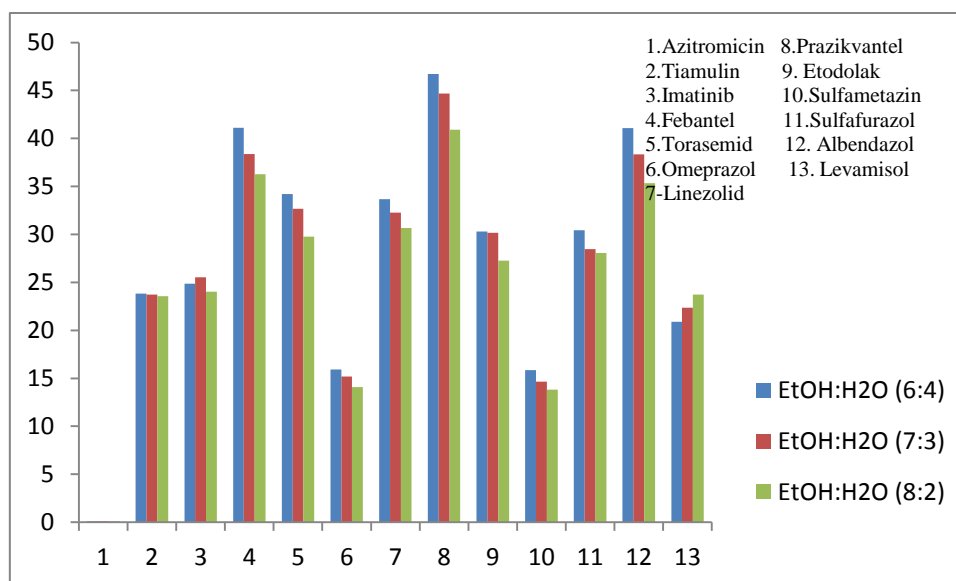
	I / %		
	EtOH:H ₂ O (6:4)	EtOH:H ₂ O (7:3)	EtOH:H ₂ O (8:2)
Azítromicin	0,12±3,24	0,11±8,66	0,1±8,39
Tiamulin	23,82±1,56	23,72±3,26	23,55±3,67
Imatinib	24,85±4,98	25,53±4,33	24,02±8,61
Febantel	41,11±3,79	38,38±1,80	36,28±2,78
Torasemid	34,21±3,53	32,66±3,56	29,77±2,54
Omeprazol	15,92±2,03	15,20±5,14	14,09±3,74
Linezolid	33,68±4,69	32,26±6,77	30,68±4,87
Prazikvantel	46,7±5,25	44,69±3,10	40,90±6,22
Etodolak	30,31±0,71	30,18±7,86	27,27±7,28
Sulfametazin	15,87±7,39	14,64±6,44	13,82±8,25
Sulfafurazol	30,44±3,60	28,48±5,20	28,07±3,48
Albendazol	41,06±7,58	38,34±6,60	35,33±5,12
Levamisol	20,88±0,92	22,35±1,07	23,72±4,50

Tablica 23. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola i vode u raznim omjerima

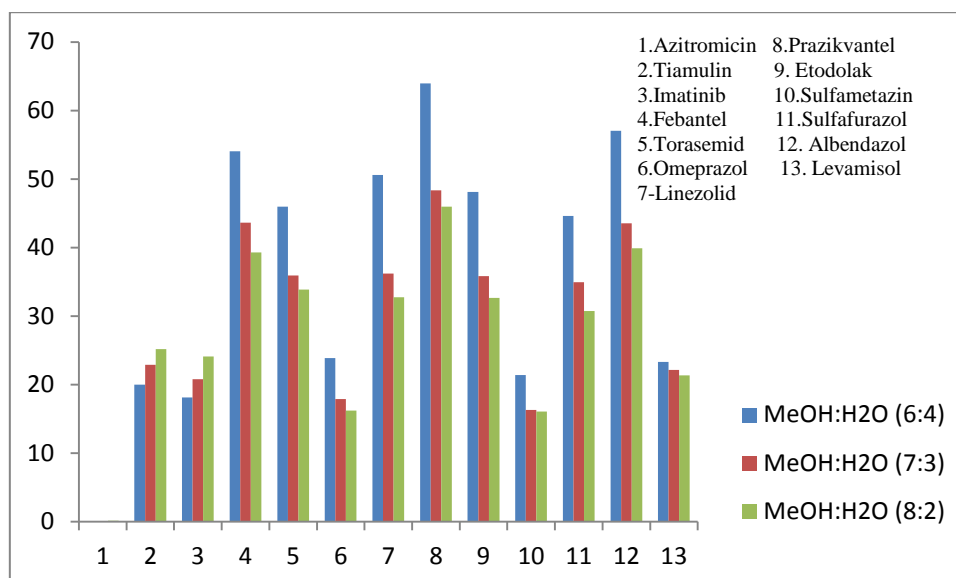
	I / %		
	MeOH:H ₂ O (6:4)	MeOH:H ₂ O (7:3)	MeOH:H ₂ O (8:2)
Azitromicin	0,11±3,01	0,12±11,83	0,13±15,75
Tiamulin	20,02±0,41	22,88±4,74	25,18±2,31
Imatinib	18,14±5,91	20,79±8,14	24,11±10,81
Febantel	54,03±6,61	43,65±3,17	39,31±7,82
Torasemid	45,95±4,92	35,95±7,04	33,87±3,72
Omeprazol	23,87±6,69	17,92±4,93	16,24±7,43
Linezolid	50,61±5,97	36,23±6,70	32,76±4,03
Prazikvantel	63,94±7,01	48,37±5,27	45,98±6,26
Etodolak	48,10±6,93	35,82±6,48	32,66±7,87
Sulfametazin	21,38±4,53	16,33±7,05	16,08±11,38
Sulfafurazol	44,63±1,35	34,93±7,64	30,74±9,20
Albendazol	57,05±4,96	43,55±2,93	39,91±7,01
Levamisol	23,31±5,89	22,15±2,83	21,34±7,08



Slika 14. Iskorištenje farmaceutika primjenom acetonitrila i vode u raznim omjerima



Slika 15. Iskorištenje farmaceutika primjenom etanola i vode u raznim omjerima



Slika 16. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola i vode u raznim omjerima

Iz tablica i grafova vidljivo je da su iskorištenja farmaceutika najveća u omjeru otapalo:voda=6:4. Također može se reći da su sva tri otapala podjednako dobra budući da im se grafovi u nijednom farmaceutiku ne razlikuju drastično. Jedini farmaceutik čije je iskorištenje minimalno, odnosno nije uopće ekstrahirano je azitromicin.

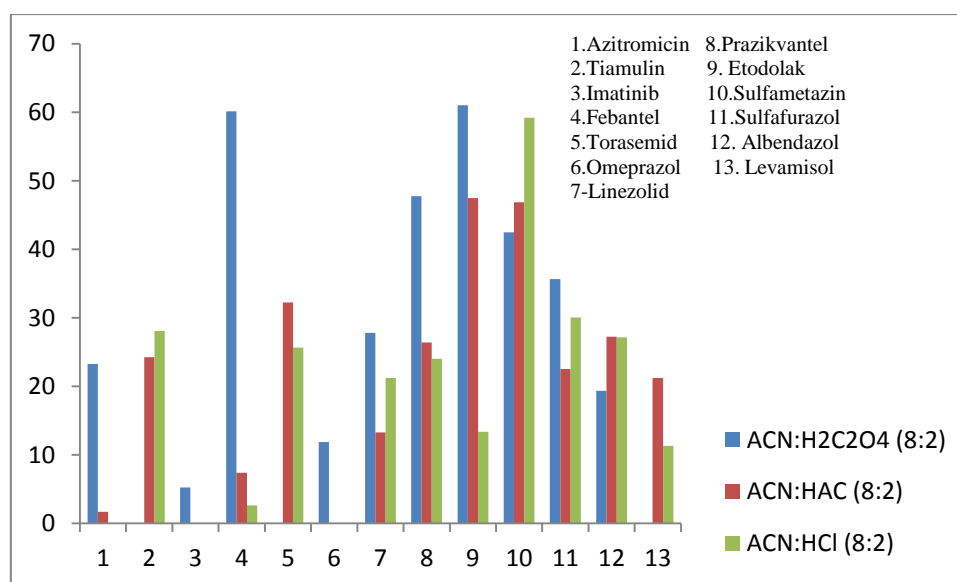
U daljnjem ispitivanju pratila su se iskorištenja farmaceutika primijenom smjese otapala sa organskim kiselinama. Korištena otapala za ovaj eksperiment bila su: acetonitril i metanol i kiseline: $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$, HAC, HCl. Omjer otapala i kiseline u svim eksperimentima bio je 8:2. Rezultati iskorištenja prikazani su u Tablicama 24. i 25. i na Slikama 17. i 18.

Tablica 24. Iskorištenje farmaceutika primjenom acetonitrila i kiselina u omjeru 8:2

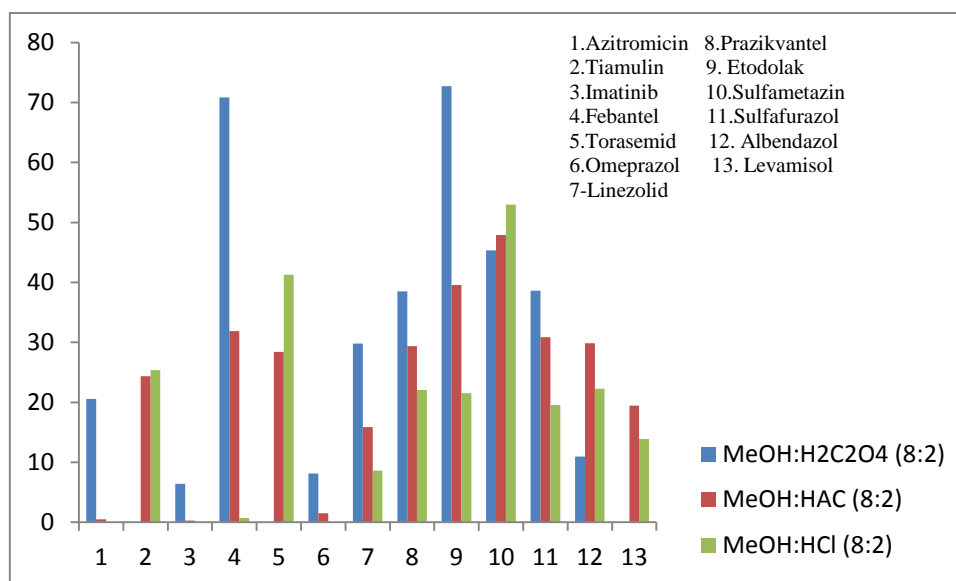
	I / %		
	ACN:H ₂ C ₂ O ₄ (8:2)	ACN:HAC (8:2)	ACN:HCl (8:2)
Azitromicin	-	1,69±36,43	-
Tiamulin	23,25±3,17	24,25±14,71	28,07±2,33
Imatinib	0,01±94,62	0,01±5,08	0,02±43,49
Febantel	5,26±1,75	7,38±39,48	2,62±15,32
Torasemid	60,1±6,97	32,26±16,24	25,64±12,5
Omeprazol	0,01±28,63	0±28,13	0±16,73
Linezolid	11,88±9,09	13,28±0,03	21,21±2,90
Prazikvantel	27,81±4,04	26,38±6,85	24,03±0,34
Etodolak	47,76±6,91	47,48±7,23	13,38±9,21
Sulfametazin	61,03±4,28	46,88±8,00	59,17±15,67
Sulfafurazol	42,48±5,48	22,52±7,47	30,05±16,36
Albendazol	35,66±5,96	27,26±1,13	27,13±5,57
Levamisol	19,34±3,16	21,20±6,26	11,33±2,93

Tablica 25. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola i kiselina u omjeru 8:2

	I / %		
	MeOH:H ₂ C ₂ O ₄ (8:2)	MeOH:HAC (8:2)	MeOH:HCl (8:2)
Azitromicin	-	0,47±4,09	-
Tiamulin	20,55±6,49	24,36±2,16	25,39±12,33
Imatinib	0,02±51,15	0,26±7,66	0,03±6,86
Febantel	6,43±13,23	31,90±2,84	0,69±40,03
Torasemid	70,85±8,37	28,39±3,86	41,28±4,06
Omeprazol	0,01±13,83	1,53±20,11	0±4,28
Linezolid	8,14±15,23	15,86±6,83	8,61±17,34
Prazikvantel	29,80±8,82	29,39±2,01	22,04±9,05
Etodolak	38,48±10,08	39,54±0,56	21,5±16,9
Sulfametazin	72,73±6,43	47,87±13,04	52,96±8,33
Sulfafurazol	45,31±3,26	30,84±9,76	19,55±1,30
Albendazol	38,60±4,41	29,86±5,48	22,29±6,26
Levamisol	10,96±3,20	19,45±2,28	13,91±3,95



Slika 17. Iskorištenje farmaceutika primjenom acetonitrila i kiselina u omjeru 8:2



Slika 18. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola i kiselina u omjeru 8:2

Iz dobivenih grafova vidljivo je da na iskorištenja ispitivanih farmaceutika znatno utječu odabrane kiseline. Najbolje iskorištenje pokazuju febantel i etodolak u kombinaciji otapala i H₂C₂O₄. Sulfametazin također ima dobro iskorištenje u kombinaciji otapala i HCl. U ovom nizu eksperimentu najniža iskorištenja imaju imatinib i omeprazol.

S ciljem dobivanja što boljih iskorištenja za sve farmaceutike, posebice za azitromicin, u daljnjem eksperimentu ispitivana je kombinacija natrijevog hidroksida i metanola u omjerima 1:1, 2:8 i 9:1 te natrijevog hidroksida i acetonitrila u omjeru 2:8. Osim navedenih kombinacija u ovom eksperimentu ispitani su i omjeri metanola, acetonitrila i natrijevog hidroksida u omjeru 4:4:2 te kombinacije metanola sa acetonitrilom i acetonom, obje u omjeru 1:1. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 26 - 28 i na Slikama 19 - 21.

Tablica 26. Iskorištenje farmaceutika primjenom NaOH i MeOH u raznim omjerima

	I / %		
	NaOH:MeOH (1:1)	NaOH:MeOH (2:8)	NaOH:MeOH (1:9)
Azitromicin	8,26±12,48	29,29±5,27	25,51±5,31
Tiamulin	5,46±17,44	69,39±2,75	72,38±4,04
Imatinib	18,19±9,90	48,28±7,16	61,47±2,77
Febantel	1,05±3,47	1,22±21,15	0,19±3,67
Torasemid	13,61±9,42	46,38±3,48	45,91±2,20
Omeprazol	6,04±8,28	25,34±7,19	20,79±7,86
Linezolid	8,32±8,83	38,34±5,70	42,47±1,95
Prazikvantel	13,03±6,33	67,03±4,14	71,59±0,72
Etodolak	18,89±5,15	81,92±6,66	94,13±0,66
Sulfametazin	1,63±10,81	22,78±4,48	28,51±3,12
Sulfafurazol	7,11±2,71	55,40±2,93	50,33±0,82
Albendazol	14,70±1,80	69,59±6,10	69,35±1,63
Levamisol	4,70±4,87	18,12±5,72	23,69±4,32

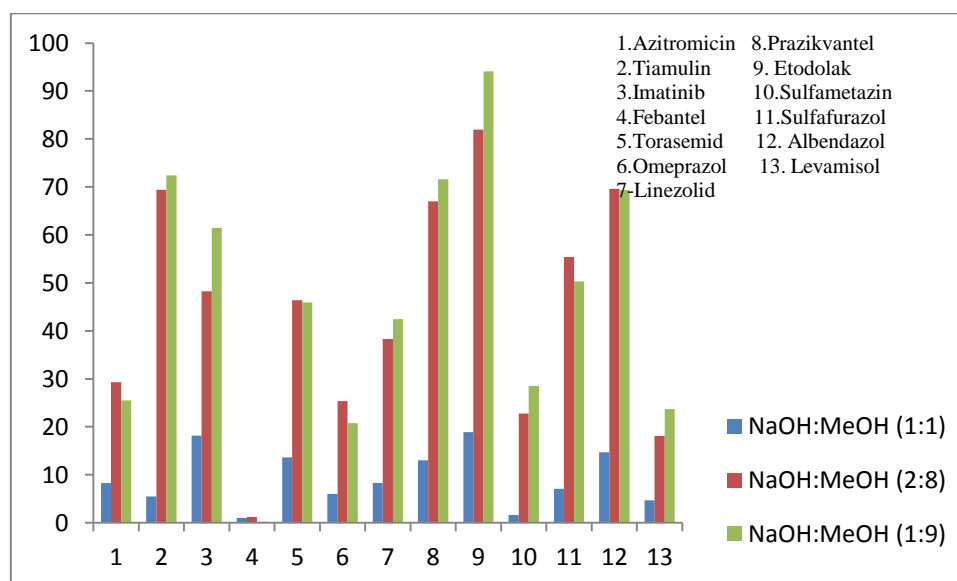
Tablica 27. Iskorištenje farmaceutika primjenom ACN-a i NaOH u omjeru 8:2

te MeOH, ACN-a i NaOH u omjeru 4:4:2

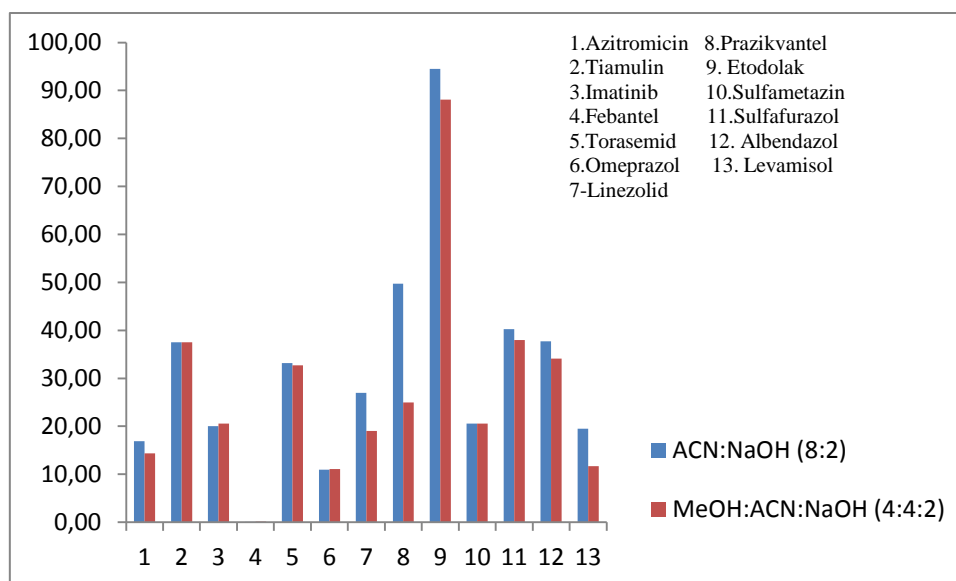
	I / %	
	ACN:NaOH (8:2)	MeOH:ACN:NaOH (4:4:2)
Azitromicin	16,92±5,82	14,39±8,13
Tiamulin	37,51±8,68	37,54±7,64
Imatinib	20,06±4,69	20,60±13,17
Febantel	0,08±23,68	0,12±38,06
Torasemid	33,21±1,53	32,69±7,61
Omeprazol	10,96±2,41	11,09±2,52
Linezolid	26,99±3,70	19,01±5,25
Prazikvantel	49,74±20,84	24,94±10,68
Etodolak	94,47±0,40	88,08±5,50
Sulfametazin	20,57±1,72	20,54±2,79
Sulfafurazol	40,26±2,59	37,99±3,96
Albendazol	37,73±9,38	34,12±0,91
Levamisol	19,50±9,69	11,72±9,21

Tablica 28. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola i ACN-a odnosno ACO-a u omjeru 1:1

	I / %	
	MeOH:ACO (1:1)	MeOH:ACN (1:1)
Azitromicin	24,51±6,82	2,83±9,44
Tiamulin	77,50±1,98	25,10±1,45
Imatinib	74,99±8,28	23,31±1,10
Febantel	100,63±6,27	36,20±2,15
Torasemid	41,20±3,48	23,51±1,70
Omeprazol	57,01±5,25	13,00±3,37
Linezolid	108,60±2,35	29,91±1,06
Prazikvantel	101,40±5,69	39,57±1,39
Etodolak	76,43±5,37	25,36±1,79
Sulfametazin	100,76±5,73	13,13±1,06
Sulfafurazol	92,16±12,81	24,88±2,43
Albendazol	91,40±15,06	34,15±3,30
Levamisol	86,49±1,77	27,10±1,54

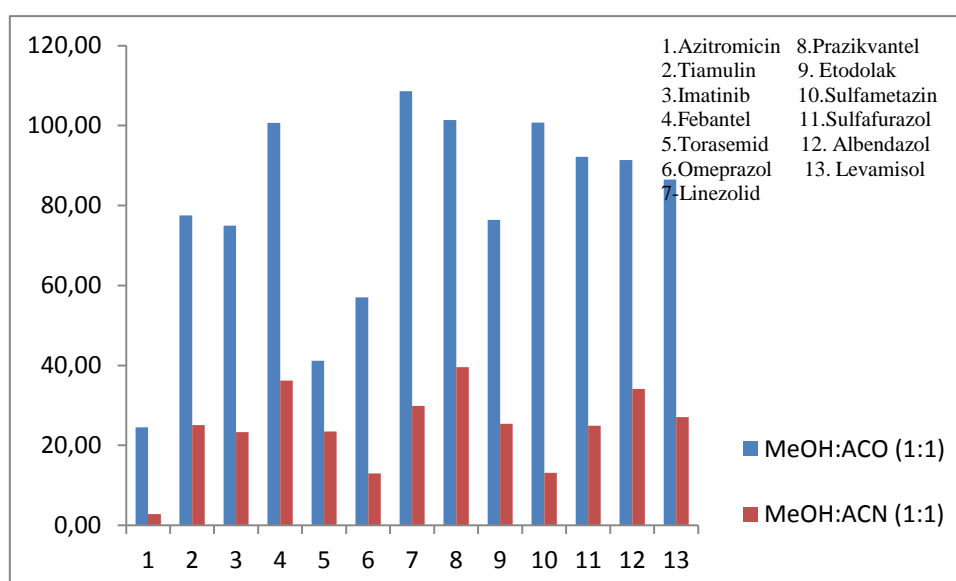


Slika 19. Iskorištenje farmaceutika primjenom NaOH i MeOH u raznim omjerima



Slika 20. Iskorištenje farmaceutika primjenom ACN-a i NaOH u omjeru 8:2

te MeOH, ACN-a i NaOH u omjeru 4:4:2



Slika 21. Iskorištenje farmaceutika primjenom metanola sa ACN-om i ACO-m u omjeru 1:1

Gledajući rezultate NaOH:MeOH u raznim omjerima vidljivo je da farmaceutici ostvaruju najveća iskorištenja u omjeru 1:9, a potom u omjeru 2:8 i na kraju u omjeru 1:1. Najbolje iskorištenje ima etodolak (oko 80%), a slijede ga tiamulin, prazikvantel i albendazol. Kombinacija NaOH i MeOH u omjeru 1:1 nije se pokazala dobrom obzirom da su iskorištenja za sve ispitivane farmaceutike jako niska, čak niža od 20%.

Na Slici 20. vidljivo je da etodolak opet ima najbolje iskorištenje (>80%) dok su iskorištenja ostalih farmaceutika dosta niska.

Kombinacija MeOH i ACO u omjeru 1:1 pokazala se izvrsnom za gotovo sve farmaceutike. Iznimka su azitromicin i torasemid.

Obzirom na dobivene rezultate vidljivo je da su se smjese metanola i acetona te metanola i NaOH pokazale kao najpogodnija otapala za 13 ispitivanih farmaceutika odnosno kao smjese otapala s najvećim potencijalom pa su daljnja ispitivanja usmjerena na optimizaciju omjera i volumena tih smjesa otapala s ciljem dobivanja što boljih rezultata.

U sljedećem eksperimentu ispitivani su razni omjeri i volumeni metanola i NaOH. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 29A - 29E i na Slikama 22A i 22B.

Tablica 29A. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

I / %				
	MeOH/ MeOH:NaOH(8:2)	MeOH:NaOH(8:2)/ MeOH	MeOH /MeOH:NaOH (9:1)	MeOH:NaOH(9:1)/ MeOH
Azitromicin	9,70±8,80	12,68±8,17	9,69± 8,59	10,57±4,27
Tiamulin	31,27±6,85	28,20±5,42	27,49±6,96	28,59±4,57
Imatinib	20,84±16,16	18,20±9,53	21,53±11,28	19,66±1,65
Febantel	0,05±27,74	0,03±18,71	0,02±2,69	0,03±7,06
Torasemid	26,88±2,12	25,61±2,40	25,10±8,81	26,50±4,32
Omeprazol	9,05±4,42	9,45±2,88	8,37±9,53	9,02±3,34
Linezolid	20,57±2,26	15,01±14,89	19,86±11,05	17,16±4,80
Prazikvantel	31,46±12,85	19,42±35,99	26,22±6,72	25,22±3,98
Etodolak	71,40±7,70	63,87±9,63	69,99±0,36	68,32±6,38
Sulfametazin	16,52±13,58	16,81±15,47	16,93±13,35	10,45±23,22
Sulfafurazol	31,84±7,53	25,75±1,37	21,18±10,67	20,21±1,64
Albendazol	31,38±8,81	24,17±5,55	31,71±0,14	30,38±4,44
Levamisol	13,11±4,58	9,66±6,53	13,19±5,22	12,86±4,25

Tablica 29B. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

	I / %		
	MeOH:NaOH(8:2)/ MeOH(2x2)	MeOH:NaOH(8:2)/ MeOH(3x2)	MeOH:NaOH(8:2)/ MeOH(4x2)
Azítromicin	18,12±2,25	19,25±2,30	19,83±7,18
Tiamulin	40,57±1,62	49,27±5,31	49,35±4,28
Imatinib	27,43±4,37	30,29±9,22	35,87±5,46
Febantel	0,09±30,29	0,15±3,79	1,36±23,73
Torasemid	35,97±4,34	37,39±6,69	40,64±2,52
Omeprazol	17,78±9,42	18,72±2,13	21,76±5,50
Linezolid	23,79±6,48	26,30±2,52	31,75±1,32
Prazikvantel	40,81±8,13	48,75±0,86	56,72±3,85
Etodolak	53,71±6,72	61,12±3,37	62,24±3,05
Sulfametazin	31,81±7,30	31,60±7,13	29,78±0,86
Sulfafurazol	42,93±2,10	44,41±7,23	47,21±4,86
Albendazol	62,05±4,47	65,50±5,24	68,30±4,48
Levamisol	22,66±7,67	24,40±1,34	25,37±0,86

Tablica 29C. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

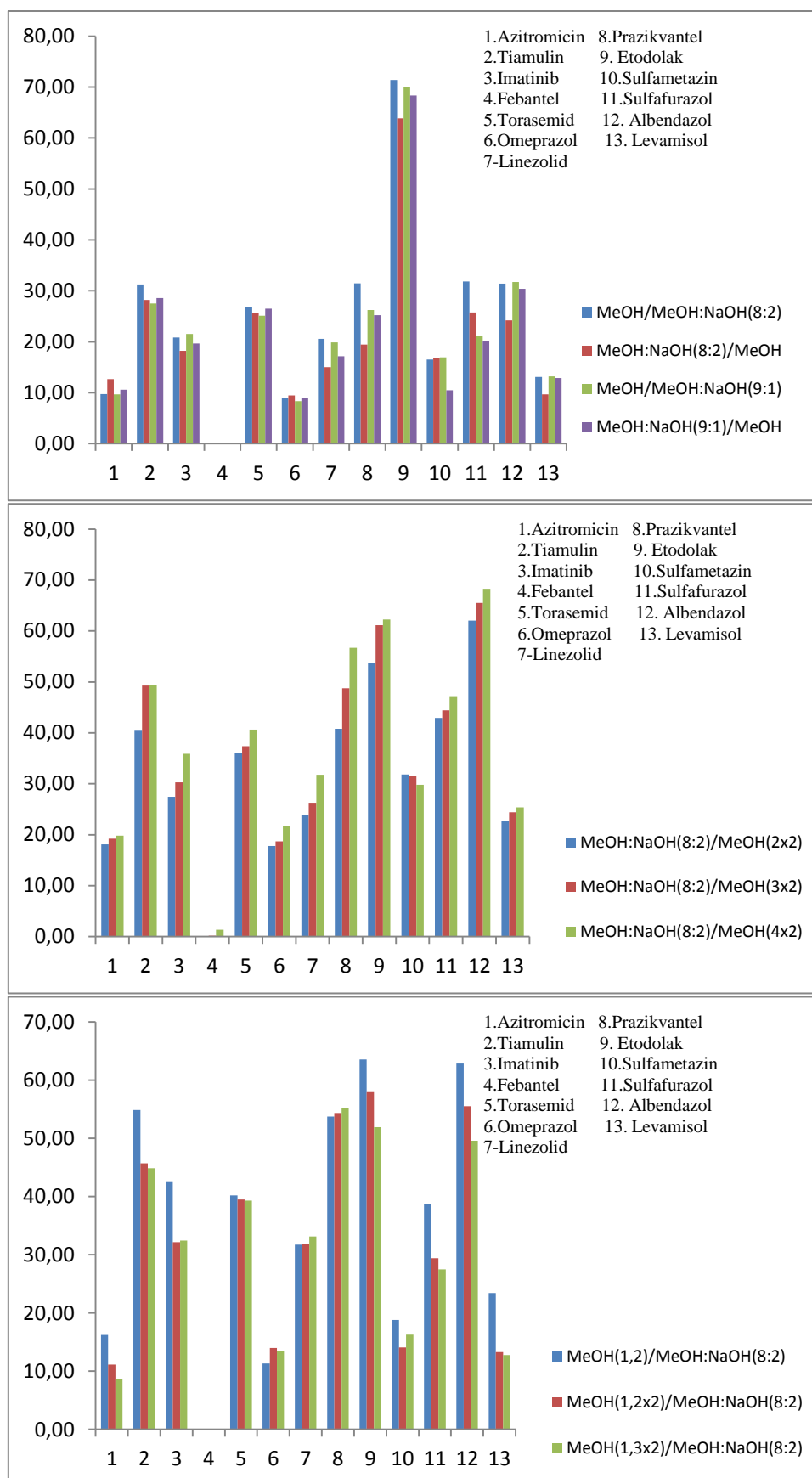
I / %			
	MeOH(1,2)/ MeOH:NaOH (8:2)	MeOH(1,2x2)/ MeOH:NaOH (8:2)	MeOH(1,3x2)/ MeOH:NaOH (8:2)
Azitromicin	16,23±0,45	11,15±2,89	8,60±8,92
Tiamulin	54,82±4,10	45,67±6,70	44,83±18,87
Imatinib	42,62±12,74	32,16±4,13	32,43±6,83
Febantel	0,04±7,95	0,03±0,99	0,02±4,58
Torasemid	40,16±3,94	39,48±1,58	39,30±1,87
Omeprazol	11,29±14,36	13,96±2,96	13,42±9,41
Linezolid	31,72±4,81	31,82±2,45	33,12±5,21
Prazikvantel	53,75±4,44	54,33±3,45	55,21±9,79
Etodolak	63,53±3,80	58,07±5,46	51,88±15,34
Sulfametazin	18,77±10,00	14,06±6,13	16,27±11,02
Sulfafurazol	38,73±6,26	29,41±0,89	27,47±32,54
Albendazol	62,84±5,36	55,52±4,87	49,55±9,48
Levamisol	23,43±7,68	13,27±10,15	12,77±28,87

Tablica 29D. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

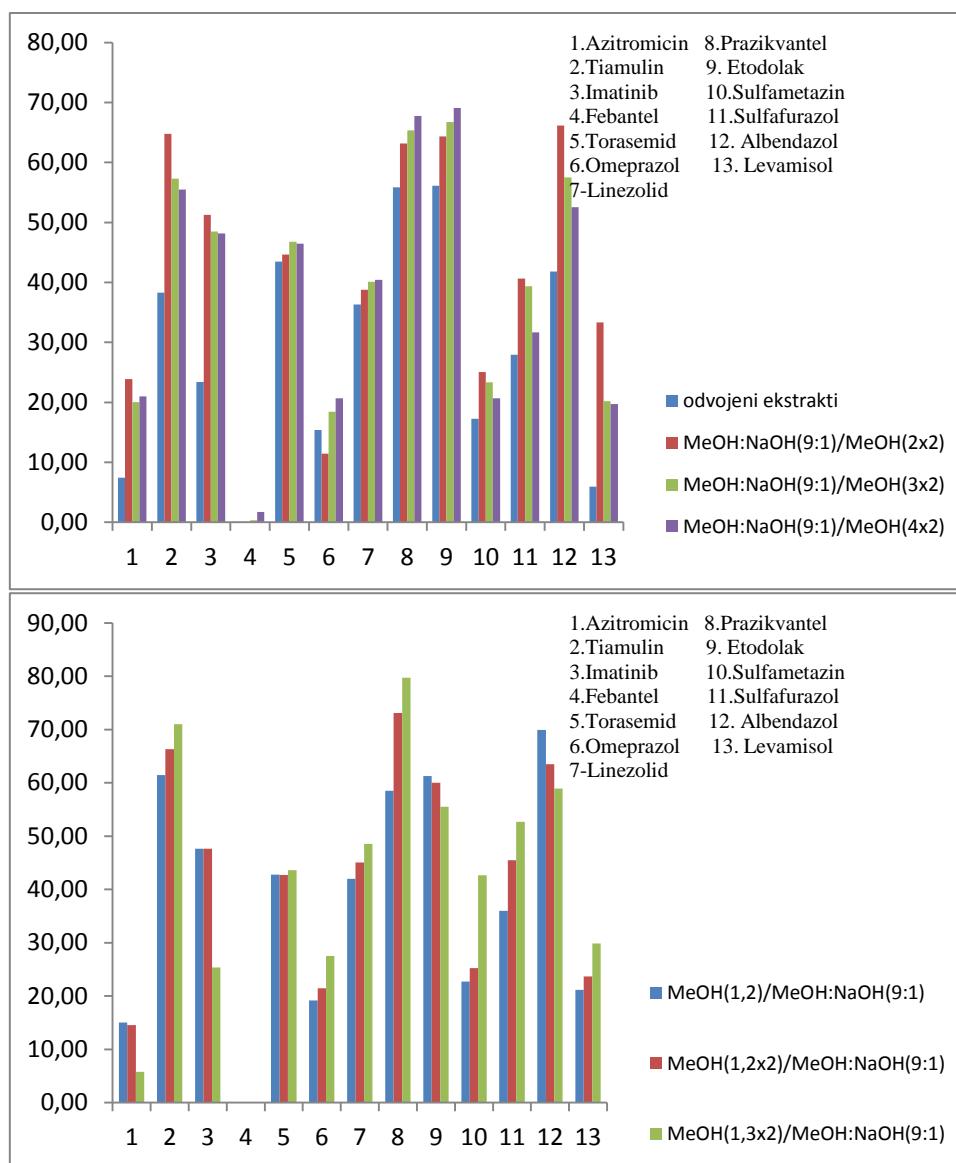
	I / %		
	MeOH:NaOH(9:1)/ MeOH (2x2)	MeOH:NaOH(9:1)/ MeOH (3x2)	MeOH:NaOH(9:1)/ MeOH (4x2)
Azitromicin	23,89±6,61	20,04±6,76	20,96±12,01
Tiamulin	64,74±1,52	57,28±10,09	55,45±8,77
Imatinib	51,25±3,93	48,49±1,82	48,16±0,99
Febantel	0,03±14,38	0,35±9,50	1,74±46,42
Torasemid	44,62±3,24	46,76±6,19	46,45±8,45
Omeprazol	11,43±1,84	18,44±2,22	20,66±11,63
Linezolid	38,76±4,75	40,12±4,04	40,44±4,20
Prazikvantel	63,17±5,67	65,36±6,14	67,74±5,56
Etodolak	64,34±3,18	66,75±9,48	69,10±5,10
Sulfametazin	25,06±4,68	23,33±5,06	20,68±5,58
Sulfafurazol	40,62±7,54	39,34±2,89	31,65±0,74
Albendazol	66,12±3,91	57,51±3,29	52,54±1,82
Levamisol	33,31±0,32	20,18±8,54	19,72±3,95

Tablica 29E. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

	I / %		
	MeOH(1,2)/ MeOH:NaOH (9:1)	MeOH(1,2x2)/ MeOH:NaOH (9:1)	MeOH(1,3x2)/ MeOH:NaOH (9:1)
Azitromicin	15,00±0,77	14,56±8,37	5,80± 16,48
Tiamulin	61,42±1,51	66,30±1,08	70,97±2,35
Imatinib	47,63±4,39	47,61±5,30	25,38±8,25
Febantel	0,04±1,69	0,08±26,82	0,10±1,79
Torasemid	42,76±6,57	42,70±0,90	43,63±3,57
Omeprazol	19,19±9,21	21,45±1,83	27,51±3,68
Linezolid	41,96±4,97	45,03±2,03	48,53±2,92
Prazikvantel	58,51±2,72	73,10±1,97	79,70±6,55
Etodolak	61,29±4,55	60,00±3,28	55,49±3,85
Sulfametazin	22,69±7,48	25,22±4,13	42,67±2,48
Sulfafurazol	35,99±8,15	45,45±3,38	52,70±4,71
Albendazol	69,89±1,58	63,49±2,23	58,95±2,84
Levamisol	21,15±6,69	23,70±7,86	29,88±12,63



Slika 22A. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima



Slika 22B. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i NaOH u raznim omjerima i volumenima

Gledajući rezultate može se zaključiti da je kombinacija MeOH i NaOH u različitim omjerima i volumenima ipak dobra samo za pojedine farmaceutike. Primjeri, etodolak pokazuje najveće iskorištenje od svih ostalih farmaceutika neovisno o kojem se omjeru i volumenu radi. Tiamulin i albendazol također imaju relativno dobra iskorištenja u ovoj kombinaciji. Međutim to se ne može reći za azitromicin, febantel, omeprazol i levamisol. Njihova iskorištenja su dosta niska, neka čak i niža od 20%.

Gledajući sve dosad prikupljene rezultate, od čistih otapala, smjesa s kiselinama, s vodom pa sve do raznih kombinacija s omjerima i volumenima može se zaključiti da se najbolja iskorištenja farmaceutika ostvaruju ipak sa metanolom i acetonom. Obzirom na to, sljedeći a ujedno i posljedni eksperiment bio je upravo kombinacija tih dvaju otapala. U ovom eksperimentu metanol i aceton kombinirani su u omjeru 1:1 i 6:4 te volumenima 5,7 i 9 mL.

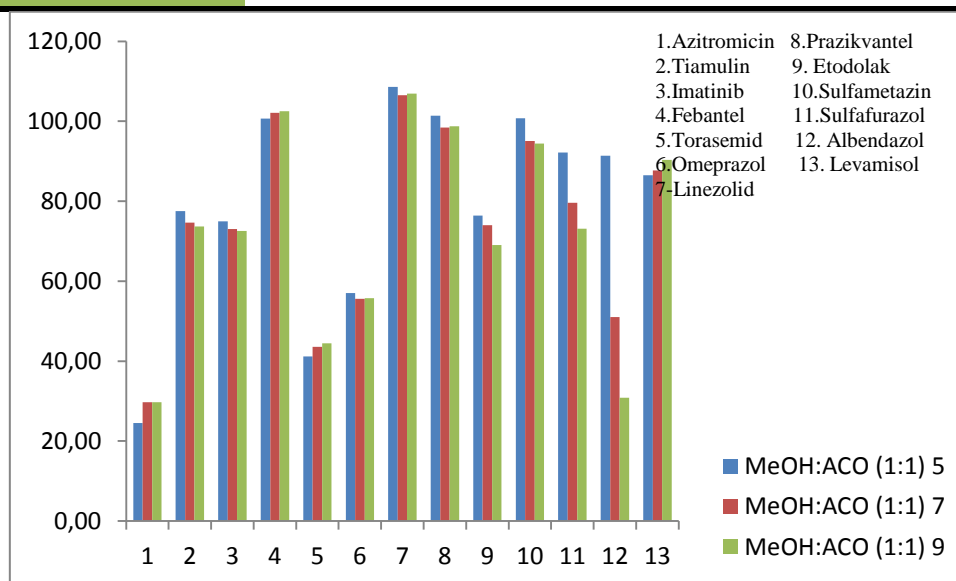
Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 30. i 31. te na Slikama 23. i 24.

Tablica 30. Iskorištenja farmaceutika prmjnom MeOH i ACO u omjeru 1:1 te volumenima 5,7 i 9 mL

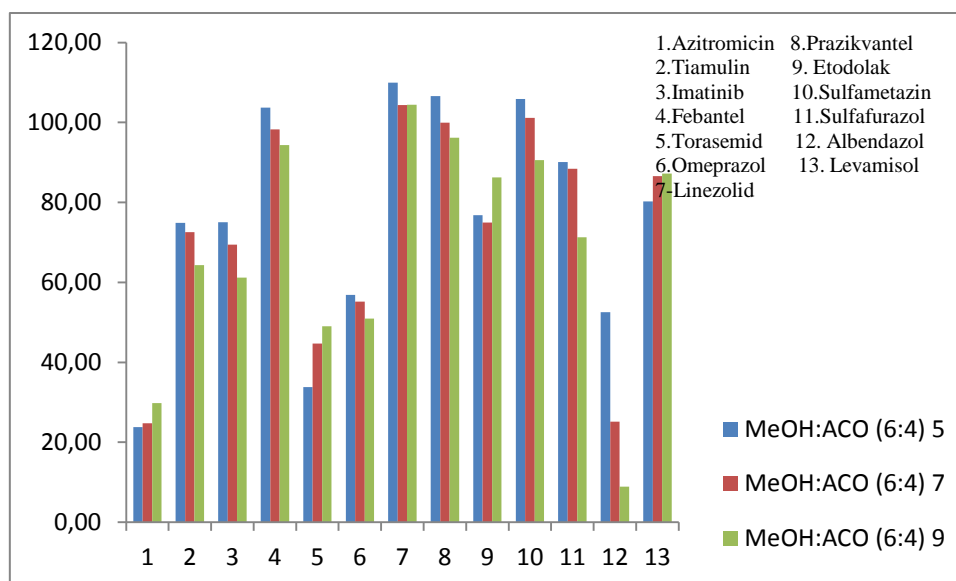
	I / %		
	MeOH:ACO (1:1), 5 mL	MeOH:ACO (1:1), 7 mL	MeOH:ACO (1:1), 9 mL
Azitromicin	24,51±6,82	29,73±14,02	29,69±5,61
Tiamulin	77,50±1,98	74,63±4,09	73,68±2,15
Imatinib	74,99±8,28	73,01±16,81	72,55±9,26
Febantel	100,63±6,27	102,10±3,06	102,51±0,51
Torasemid	41,20±3,48	43,56±8,08	44,50±8,71
Omeprazol	57,01±5,25	55,62±7,40	55,73±5,22
Linezolid	108,60±2,35	106,50±6,24	106,91±2,77
Prazikvantel	101,40±5,69	98,43±5,55	98,76±4,68
Etodolak	76,43±5,37	74,00±10,04	69,05±0,06
Sulfametazin	100,76±5,73	95,03±7,70	94,40±3,30
Sulfafurazol	92,16±12,81	79,59±9,24	73,12±8,47
Albendazol	91,40±15,06	51,05±1,81	30,82±23,22
Levamisol	86,49±1,77	87,69±5,97	90,38±8,95

Tablica 31. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i ACO u omjeru 6:4 te volumenima 5,7 i 9 mL

I / %			
	MeOH:ACO (6:4), 5 mL	MeOH:ACO (6:4), 7 mL	MeOH:ACO (6:4), 9 mL
Azitromicin	23,82±6,19	24,80±6,76	29,79±0,01
Tiamulin	74,85±3,00	72,59±6,15	64,30±2,52
Imatinib	75,02±6,19	69,47±11,56	61,16±3,95
Febantel	103,69±2,58	98,27±4,82	94,37±7,40
Torasemid	33,80±8,12	44,66±5,05	49,02±1,38
Omeprazol	56,87±4,89	55,21±7,83	50,92±3,97
Linezolid	109,94±6,60	104,38±2,61	104,41±1,10
Prazikvantel	106,55±6,50	99,91±1,35	96,18±6,61
Etodolak	76,77±11,07	74,99±2,98	86,29±4,75
Sulfametazin	105,88±8,17	101,13±5,40	90,57±8,20
Sulfafurazol	90,11±11,62	88,42±13,44	71,28±1,60
Albendazol	52,53±5,38	25,19±5,00	8,95±4,06
Levamisol	80,21±0,74	86,56±2,59	87,23±1,03



Slika 23. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i ACO u omjeru 1:1 te volumenima 5,7 i 9 mL



Slika 24. Iskorištenja farmaceutika primjenom MeOH i ACO u omjeru 6:4 te volumenima 5,7 i 9 mL

Gledajući posljednje rezultate vidljivo je kako 13 ispitivanih farmaceutika pokazuje najbolje iskorištenje u kombinaciji metanola i acetona. Za većinu farmaceutika iskorištenje je $>80\%$ što je s obzirom na prethodne rezultate i druga otapala izvrsno.

Iz svega navedenog, zaključeno je da su optimalni uvjeti za ekstrakciju raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu 5 mL smjese otapala metanol:aceton 1:1 na sorbentu C18.

4.2 VALIDACIJA

Nakon utvrđivanja optimalnih uvjeta za ekstrakciju smjese farmaceutika, potrebno je validirati cijelu metodu određivanja budući da je svaki korak iznimno bitan i može biti presudan za konačni ishod primjenjivosti metode.

U tu svrhu napravljeno je 12 razrijeđenja standardne otopine smjese od 13 farmaceutika s metanolom u rasponu od $5 \cdot 10^{-7}$ do 1 mg/L. Sediment je pripremljen na način da je na 12 uzoraka sedimenta mase 200 mg dodano po 200 μ L jedne od napravljenih standardnih otopina pri čemu se konačna koncentracija farmaceutika u tako pripremljenim uzorcima sedimenta kretala od $5 \cdot 10^{-5}$ do 100 μ g/g.

Tablica 32. Raspon linearnosti, koeficijent korelacije, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) za MSPD-UHPLC-MS metodu

Farmaceutik	Linearno područje $\mu\text{g/g}$	Jednadžba linearnosti	R^2	GD, $\mu\text{g/g}$	GK, $\mu\text{g/g}$
Azitromicin	25-100	$A=1,8533\gamma-12,833$	0,9997	12,5	25
Tiamulin	0,25-100	$A=864,3\gamma+66,674$	0,9956	0,025	0,25
Imatinib	0,5-100	$A=231,53\gamma-919,14$	0,9917	0,25	0,5
Febantel	0,0025-50	$A=1139,9\gamma+1111$	0,9975	0,00025	0,0025
Torasemid	0,25-100	$A=514,28\gamma+918,01$	0,9943	0,025	0,25
Omeprazol	0,25-50	$A=1201,3\gamma+1786,7$	0,9969	0,025	0,25
Linezolid	0,5-50	$A=88,021\gamma+37,151$	0,9988	0,25	0,5
Prazikvantel	0,005-100	$A=673,46\gamma-300,81$	0,9993	0,0025	0,005
Etodolak	0,25-100	$A=147,41\gamma-53,861$	0,9977	0,025	0,25
Sulfametazin	0,025-50	$A=356,07\gamma+477,92$	0,9944	0,005	0,025
Sulfafurazol	5-50	$A=8,5922\gamma-5,8621$	0,9983	0,5	5
Albendazol	0,025-50	$A=2102,5\gamma+4000,4$	0,9903	0,005	0,025
Levamisol	0,025-50	$A=3128,3\gamma+987,99$	0,9981	0,005	0,025

Određeno je linearno područje u uzorcima sedimenta u rasponu koncentracije od 0,0025 do 100 $\mu\text{g/g}$ ovisno o farmaceutiku. Umjerne krivulje pokazuju odnos površine kromatografske krivulje i analita. U Tablici 32. prikazani su rezultati dobiveni linearnom regresijskom analizom. Prikazani validacijski parametri su: linearno područje, jednadžba, R^2 (korelacijski faktor) te granica detekcije i kvantifikacije. Granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) određene su iz omjera signala i šuma usporedbom mjerenog signala ispitivanog farmaceutika najmanje poznate koncentracije s mjernim signalom slijepog uzorka. Za granicu detekcije taj omjer treba biti 3, a za granicu kvantifikacije 10.

Vrijednosti granice detekcije kreću se od 0,00025 do 12,5 $\mu\text{g/g}$, a granice kvantifikacije od 0,0025 do 25 $\mu\text{g/g}$. Visoki koeficijenti korelacije za sve farmaceutike dokaz su linearnosti metode.

Daljnji korak u validaciji bio je odrediti preciznost metode. Kao što je već navedeno, preciznost se iskazuje kao ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost se ispitala tijekom pet uzastopnih ponavljanja u istom danu, a obnovljivost tijekom pet uzastopnih ponavljanja u tri različita dana. Rezultati tog ispitivanja navedeni su u Tablici 33.

Tablica 33. Ponovljivost i obnovljivost

Farmaceutik	Ponovljivost / %	Obnovljivost / %
Azitromicin	6,20	8,67
Tiamulin	7,20	13,98
Imatinib	10,1	13,58
Febantel	4,11	12,04
Torasemid	8,29	17,93
Omeprazol	7,26	22,86
Linezolid	5,66	14,17
Prazikvantel	6,09	13,31
Etodolak	11,77	12,36
Sulfametazin	8,43	17,65
Sulfafurazol	9,68	15,63
Albendazol	3,55	15,49
Levamisol	6,01	9,98

Najmanje relativno standardno odstupanje za ponovljivost ima albendazol 3,55 %, a najveće etodolak 11,77 %, dok se sve ostale vrijednosti kreću između 4,11 i 10,1 %. Odstupanja veća od 10 % mogu se tumačiti mogućim utjecajem matice uzorka. Najbolja obnovljivost, odnosno najmanje relativno standardno odstupanje dobiveno je za azitromicin 8,67 %, a najveće za omeprazol 22,86 %, dok se sve ostale vrijednosti kreću između 12,03 i 17,7 %.

Tablica 34. prikazuje iskorištenja trinaest farmaceutika za tri koncentracijska nivoa kako bi se ispitao utjecaj koncentracije unutar linearnog područja na učinkovitost ekstrakcije analita.

Tablica 34. Iskorištenja farmaceutika primjenom optimalnih uvjeta MSPD metode unutar linearnog područja

Farmaceutik	Koncentracija, μg/g	Iskorištenje ± RSO, % (n=3)
Azitromicin	25	22,04±2,05
	50	23,92±3,90
	100	26,82±12,52
Tiamulin	5	77,06±5,02
	25	76,33±3,50
	100	80,97±3,70
Imatinib	5	40,97±15,23
	25	53,92±7,26
	100	71,63±21,56
Febantel	0,25	92,28±7,55
	12,5	98,07±5,02
	50	97,62±4,44
Torasemid	0,5	55,31±8,84
	25	41,84±3,18
	100	38,01±3,47
Omeprazol	0,5	58,21±13,23
	12,5	61,82±3,32
	50	69,84±2,27
Linezolid	0,5	46,91±0,91
	12,5	81,08±0,93
	50	96,87±5,08
Prazikvantel	0,25	97,20±16,81
	12,5	94,40±8,21
	50	94,45±15,83
Etodolak	5	86,11±7,89
	25	85,82±17,37
	100	80,94±2,38
Sulfametazin	0,5	86,19±6,22
	12,5	92,22±7,20
	50	99,05±3,55
Sulfafurazol	12,5	75,57±9,08
	25	79,74±11,92
	50	82,73±5,43
Albendazol	0,5	59,27±6,50
	12,5	81,69±1,83
	50	107,53±8,14
Levamisol	0,25	46,96±8,87
	12,5	75,51±8,92
	50	90,70±1,41

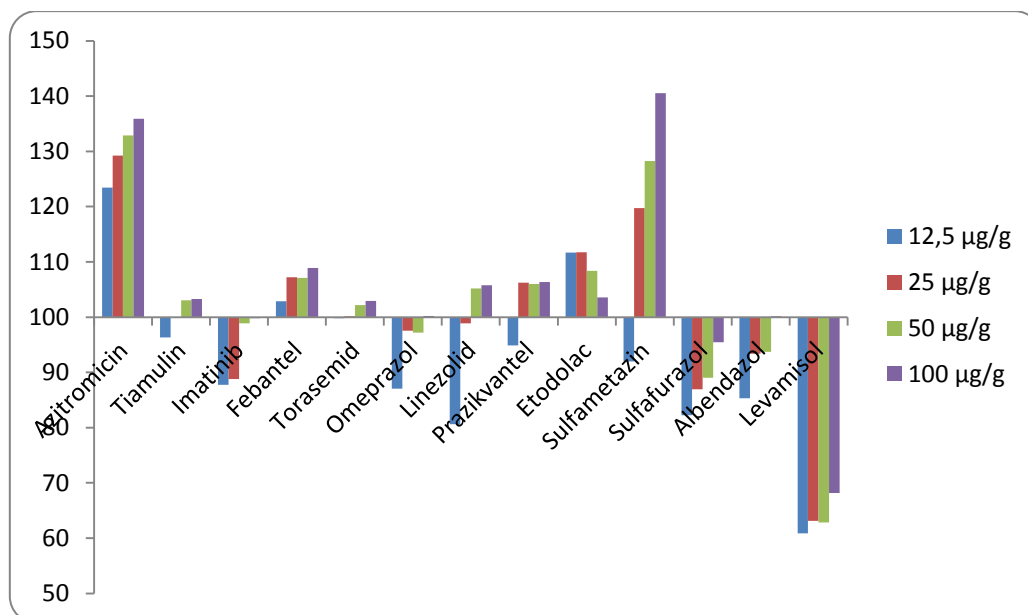
Iz tablice 34. vidljivo je kako iskorištenja većine farmaceutika nisu ovisna o koncentraciji unutar linearnog područja poput azitromicina, tiamulina, febantela i sulfafurazola dok kod nekih promjenom koncentracije odnosno njenim rastom, rastu ili padaju iskorištenja.

4.3 UTJECAJ MATICE

Utjecaj matice još je jedan od važnih elemenata nužnih za određivanje u ovoj metodi. Ovisi o vrsti analita, pripremi uzorka i instrumentu te može nastati kao posljedica raznih interakcija između analiziranih farmaceutika i tvari prisutnih u pripremljenom uzorku.

Budući da je matica sedimenta vrlo složena obzirom da sadrži razne minerale, anione, katione i slično vrlo je važno procijeniti njen utjecaj na analitički rezultat, kako bi se taj utjecaj mogao svesti na prihvatljivu mjeru.

S ciljem ispitivanja utjecaja matice radila se usporedba podataka dobivenih linearnom regresijom za farmaceutike u sedimentu i za farmaceutike u čistom otapalu. Na Slici 25. prikazan je utjecaj matice svih farmaceutika za njihove koncentracije u sedimentu 12,5, 25, 50, 100 µg/g.



Slika 25. Utjecaj matice pri 4 različite koncentracije

Iz grafičkog prikaza je vidljivo kako je utjecaj matice na farmaceutike dosta različit. Ovisno o koncentraciji kod nekih farmaceutika je utjecaj veći, a kod nekih manji. Velika većina ispitivanih farmaceutika, točnije, svi osim: azitromicina, sulfametazina i levamisola ne pokazuju značajan utjecaj matice osim pri najnižoj koncentraciji (kod linezolida, sulfafurazola) jer je promjena signala manja od 10%. Iako većina farmaceutika ima isti trend (prigušenje ili povećanje) utjecaja matice, kod etodolaka je primjećen obrnuti trend, tj. kod nižih koncentracija prisutan je veći signal dok povećanjem njegove koncentracije signal se smanjuje. Najveći utjecaj matica ima na levamisol (smanjenje signala) te na azitromicin i sulfametazin (povećanje signala).

4.4 ANALIZA REALNIH UZORAKA

Optimirana i validirana metoda primijenjena je za analizu realnih uzoraka. Kao realni uzorci poslužili su uzorci sedimenta priključljeni na različitim lokacijama u okruženju proizvodnje farmaceutskih pripravaka. Realni uzorci sedimenta analizirani su metodom standardnog dodatka pri čemu je početni uzorak analiziran bez dodatka standardnih otopina farmaceutika u jednom slučaju te uz dodatak 100 μL standardne otopine smjese farmaceutika koncentracije 25 odnosno 50 $\mu\text{g/mL}$ na 200 mg svakog uzorka realnog uzorka, a dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 35.

Tablica 35. Koncentracije farmaceutika u realnim uzorcima u usporedbi sa granicama detekcije i kvantifikacije primijenjene metode

FARMACEUTICI	GD, µg/g	GK, µg/g	1	2	3	4	5	6	7
Azitromicin	12,5	25	n.d.	n.d.	n.d.	<GD	<GD	n.d.	n.d.
Tiamulin	0,025	0,25	2,02	n.d.	n.d.	n.d.	0,40	<GK	1,28
Imatinib	0,25	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	<GK	n.d.	<GK	n.d.
Febantel	0,00025	0,0025	6,94	3,62	8,20	5,67	1,80	0,87	3,86
Torasemid	0,025	0,25	68,77	6,20	3,42	2,08	2,31	1,35	11,17
Omeprazol	0,025	0,25	0,81	2,60	1,74	<GK	2,41	n.d.	3,77
Linezolid	0,25	0,5	<GD	<GD	0,82	0,62	2,40	<GK	<GD
Prazikvantel	0,0025	0,005	1,00	1,25	10,66	8,60	1,27	n.d.	2,04
Etodolak	0,025	0,25	3,23	1,75	1,27	0,62	3,63	0,43	1,70
Sulfametazin	0,005	0,025	6,84	3,76	22,99	0,08	1,04	0,75	2,72
Sulfafurazol	0,5	5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Albendazol	0,005	0,025	2,86	3,62	0,46	1,02	1,44	n.d.	2,63
Levamisol	0,005	0,025	1,70	1,33	0,06	n.d.	0,32	0,49	4,88

Iz priložene tablice vidljivo je da su najčešće koncentracije ispitivanih farmaceutika u realnim uzorcima između 1,20- 3,90 µg/g. Najmanje prisutnih farmaceutika pokazuju uzorci sedimenta 2 i 3. U spomenutim sedimentima detektirano je osam, odnosno devet farmaceutika od ukupnih trinaest. U oba slučaja izostaju azitromicin, tiamulin, imatinib i sulfafurazol, a u sedimentu 2 nije detektiran ni linezolid. Najviše farmaceutika pronađeno je u uzorku sedimenta 5, i to redom tiamulin, febantel, torasemid, omeprazol, linezolid, prazikvantel, etodolak, sulfametazin, albendazol i levamisol. Od njih 10, u sedimentu 5 je određena najviša koncentracija etodolaka 3,63 µg/g, dok se koncentracije svih ostalih pronađenih farmaceutika kreću od 0,32-2,41 µg/g. Ipak, od sedam ispitivanih uzoraka sedimenata, za sediment 1 može se reći da je najzagađeniji jer su koncentracije pojedinih detektiranih farmaceutika vrlo visoke (torasemid 68,77 µg/g, febantel 6,94 µg/g, sulfametazin 6,84 µg/g). Farmaceutici prisutni u svim ispitivanim realnim uzorcima su: febantel, torasemid, etodolak i sulfametazin, dok je sulfafurazol jedini koji nije detektiran ni u jednom ispitivanom uzorku. Koncentracija

farmaceutika u uzorcima analiziranih sedimenata varira ovisno o trenutnoj proizvodnji farmaceutskih pripravaka kao i o vremenu provedenom od uzorkovanja do analize.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu prikazan je razvoj metode za određivanje 13 farmaceutika različitih fizikalno-kemijskih svojstava u uzorcima sedimenta. Pomoću MSPD metode izolirani su iz uzoraka sedimenta, a potom su određivani i kvantificirani UHPLC uređajem vezanim na spektrometar masa. Određeni su optimalni uvjeti, odnosno učinkovitost ekstrakcije primjenom raznih čistih otapala i njihovih smjesa kao i njihovih smjesa s kiselinama i NaOH. Najveća iskorištenja farmaceutika postignuta su za kombinaciju otapala metanol:aceton=1:1 pa je za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika kroz čvrstu fazu odabrana upravo ta kombinacija otapala volumena 5 mL na sorbensu C18.

Dobivene visoke vrijednosti R^2 su potvrda linearnosti ove metode. Za ispitivane farmaceutike granice detekcije dobivene su u rasponu od 0,00025 do 12,5 µg/g, a granice kvantifikacije od 0,0025 do 25 µg/g. Također, bilo je važno odrediti i preciznost razvijene metode koja se iskazuje kao ponovljivost i obnovljivost. Dobiveni rezultati su zadovoljavajući. Najmanje relativno standardno odstupanje za obnovljivost iznosi 8,67 %, dok se ostale vrijednosti kreću između 12,03 i 17,7 %. Najmanje relativno standardno odstupanje za ponovljivost iznosi 3,55 %, dok se ostale vrijednosti kreću između 4,11 i 10,1 %.

Većina farmaceutika ima isti trend (prigušenje ili povećanje) utjecaja matice, međutim kod etodolaka je primjećen obrnuti trend, tj. kod nižih koncentracija prisutan je veći signal koji povećanjem koncentracije opada. Najveći utjecaj matica sedimenta ima na levamisol (smanjenje signala) te na azitromicin i sulfametazin (povećanje signala).

Razvijenom i validiranom metodom analizirani su realni uzorci sedimenta. Njih ukupno četiri od trinaest detektirani su u svih sedam ispitivanih realnih uzoraka, a to su: febantel, torasemid, etodolak i sulfametazin. Najviše prisutnih farmaceutika ima u sedimentu 5, međutim najzagađeniji ispitivani sediment je 1 u kojem je detektirana i najveća koncentracija prisutnog farmaceutika torasemida koja iznosi čak 68,77 µg/g.

Ovaj rad dobar je pokazatelj kako MSPD metoda može biti efektivna kada je riječ o analizi farmaceutika u realnim uzorcima sedimenta zbog jednostavne pripreme uzoraka te niskih troškova metode.

6. LITERATURA

- [1] V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, **26** (2007) 534-556.
- [2] A. Kar, Medicinal chemistry, New Age International (P) Ltd. Publishers, New Delhi, 2007., str. 651- 661.
- [3] <http://www.stetoskop.info/antihelminthici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> (svibanj 2017.)
- [4] <http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/10408440490464697> (svibanj 2017.)
- [5] M.Hranjec, Antihelminthici, interna skripta, FKIT, 2016.
- [6] A. D. Dayan, Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Tropica* **86** (2003) 141–159.
- [7] <http://www.genera.hr/pro/hr/1620/#.U7L4mUDm7gE> (svibanj 2017.)
- [8] http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2521&Itemid= (svibanj 2017.)
- [9] http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library (svibanj 2017.)
- [10] M.Hranjec, Antibiotici, interna skripta, FKIT, 2016.
- [11] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound> (svibanj 2017.)
- [12] http://hrcak.srce.hr/index.php?show=clanak&id_clanak_jezik=110890 (svibanj 2017.)
- [13] <https://en.wikipedia.org/wiki/Linezolid> (svibanj 2017.)
- [14] <http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/80Citostatici/Citostatici.html>, (svibanj 2017.)
- [15] S.Raić.Malić, Citostatici, interna skripta, FKIT, 2015.
- [16] A. A. Gouda, W. S. Hassan, Spectrophotometric determination of etodolac in pure form and pharmaceutical formulations, *Chem Cent J.* **14** (2008) 2-7.
- [17] N. M. Hafner, A. Eopar, B. Podobnik, A. B. Cizerle, A. Kosak, *Acta Crystallogr., Sect. C: Cryst. Struct. Commun.*, **C45** (2004) 1-18.
- [18] H. B. Jayasiri, Pharmaceutically Active Compounds (PhACs): A Threat for aquatic environment, National aquatic resources research and development agency, Crow Island, Šri Lanka, 2013.
- [19] W. W. Buchberger, Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment, *Journal of Chromatography*, **1218** (2011) 603–618.
- [20] K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment, Part II, *Chemosphere*, **75** (2009) 435–441.

- [21] M. Silvia Diaz-Cruz, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, **22** (2003) 340-349.
- [22] D. E. Raynie: *Extraction*, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, Academic Press (2000), str. 118
- [23] R. K. Jyothi, Jin-Young Lee, *Liquid-Liquid Extraction*, VDM Verlag , 2010, str. 56.
- [24] F. Settle, *Hanbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997. str. 18-19, 24-33, 147-153.
- [25] R. N. Reeve, *Introduction to environmental analysis*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 2002. str. 169-171.
- [26] <http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=superkriti%C4%8Dni+fluid> (lipanj 2017.)
- [27] V. Lopez-Avila: *Microwave-Assisted Extraction*, Midwest Research Institute, Cupertino, CA, USA, Academic Press (2000), str. 1389.
- [28] R. Đurović, T. Đorđević, *Modern extraction techniques for pesticide residues determination in plant and soil samples*, *Pesticides in the Modern World - Trends in Pesticides Analysis*, InTech, Rijeka, Croatia, 2011., str. 221-247.
- [29] S. A. Barker, *Matrix solid-phase dispersion*, *J. Chromatogr. A* **885** (2000) 115-127.
- [30] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-238.
- [31] A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic Methods*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002, str. 258-261.
- [32] M. W. Dong, *Modern HPLC for practicing Scientist*, Wiley Interscience , 2006, str. 91
- [33] S. Babić, *Upravljanje kvalitetom*, interna skripta, FKIT, 2017.
- [34] I. Molnár, *Computerized design of separation strategies by reversed-phase liquid chromatography: Development of DryLab software*, *J. Chromatogr. A* **965** (2002) 175–194.

7. ŽIVOTOPIS

████████████████████ Pohađala sam Osnovnu školu Jurja Dalmatinca u Pagu nakon koje sam upisala opću gimnaziju Bartola Kašića. Upisala sam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije 2011. godine, studij Primijenjena kemija. Praksu sam odradila 2015. godine u tvrtki Komunalije d.o.o. Novalja na poslovima ispitivanja mora i na uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Novalje. Tema završnog preddiplomskog rada bila mi je "Derivati iminokumarina kao potencijalni fluorescentni pH senzori". Radi se o eksperimentalnom završnom radu kojeg sam provodila na Zavodu za opću i anorgansku kemiju pod vodstvom mentorice dr.sc. Lidije Furač.

Nakon završenog preddiplomskog studija, upisala sam diplomski studij na istom fakultetu, modul Organska kemija.

Od stranih jezika koristim engleski i talijanski jezik u govoru i pismu. U radu na računalu koristim Microsoft Word, Excel, PowerPoint, te programske pakete Mathematica, Matlab i Scientist.